



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Fenótipos complexos distintos e componentes genéticos coincidentes:
Um estudo sobre hipodontia e histórico familiar de câncer**

Brasília
2016

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

RAFAELA DE CESARE PARMEZAN TOLEDO

**Fenótipos complexos distintos e componentes genéticos coincidentes:
Um estudo sobre hipodontia e histórico familiar de câncer**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia
Animal do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de
Brasília para a obtenção de título
de doutor na área de genética.

Brasília
2016

À minha família, dedico.

Agradecimentos Formais

Agradeço a oportunidade de realizar toda a minha formação profissional na Universidade de Brasília, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal;

Agradeço à CAPES pela bolsa oferecida durante 48 meses de realização dos trabalhos, assim como aos diversos financiamentos proporcionados pela FAP/DF e CNPq que permitiram a realização dos experimentos;

Agradeço à Dra. Silviene Fabiana de Oliveira pela orientação, carinho, paciência e amizade durante esses dez anos em que trabalhamos juntas. Agradeço também pela grande generosidade em dividir seu conhecimento comigo;

Agradeço ao Dr. Ricardo Machado Cruz e sua equipe que prontamente me ajudaram no recrutamento de voluntárias para a execução deste trabalho;

Agradeço ao Dr. Eduardo Khouri e à querida amiga Camila Xavier de Carvalho que também muito me auxiliaram no recrutamento de pacientes para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço imensamente a todas as voluntárias que dedicaram seu tempo e dividiram informações sobre suas famílias que proporcionaram a realização deste trabalho,

Agradeço à banca examinadora pelo aceite em participar desse momento tão especial e pelas grandes considerações ao trabalho;

Agradeço à Dra. Juliana Mazzeu e à Dra. Aline Pic-Taylor pela ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, assim como pela ajuda prestada ao meu trabalho no período em que a Dra. Silviene esteve afastada durante a realização de seu pós-doc;

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Humana da UnB, obrigada pela amizade, companhia, momentos agradáveis e cafés que tivemos juntos, Raphael Bonadio, Sabrina Paiva, Camila Xavier, Ana Carolina Arcanjo, Harumy Sakata, Yasmin Lima, Fabíola Turiel, Brisa Granados, Matheus de Castro, Mariana Marzullo e Carolina Gontijo, em especial àquelas que contribuíram diretamente ao trabalho, Ana Paula Oliveira, Brisa e Fabíola;

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética da Faculdade de Saúde, obrigada pelos ensinamentos e amizade, Aluísio Xavier, Pollyanna Almeida, Pedro Guilherme Rodrigues, Claudiner de Oliveria, Marcella Motta e Dra Íris Ferrari;

Agradecimentos Informais

Agradeço ao pessoal que mora comigo, no apartamento mais legal de Brasília, carinhosamente apelidado de “casa dos frangos”. Obrigada pelos momentos especiais que passamos juntos durante esse ano;

Agradeço aos meus mais estimados grupo de amigos, carinhosamente apelidados de “Cortiço Gastronômico”, Caroline Valadão (Dona Cunha), Carolina Borges (Kdol), Juliana Bolzan (Ju), Mariana Catunda (Mari), Ana Carolina Vaqueiro (Dominó) e Ingrid Gracielle (Ingridera), nossos encontros semanais foram sempre ótimos e agora depois da defesa podemos retomar nossos encontros;

Agradeço em especial, meu grande amor, Henrique, muito obrigada por sempre estar ao meu lado, pela dedicação, e por me apoiar mesmo nos momentos mais difíceis de nossa jornada juntos, assim como por me dar uma família maravilhosa;

Por fim, agradeço àqueles que tornaram tudo possível, minha família, em especial meus pais, Arthur e Regina, que desde cedo me incentivaram a estudar e me deram oportunidades para construir meu próprio caminho;

A todos, agradeço imensamente.

O muro é do diabo.

RESUMO

O câncer é uma doença de herança complexa, com taxa de letalidade variável em decorrência do tipo. De modo geral, a incidência tem aumentado insistentemente ao longo das últimas décadas. Há um grande interesse da comunidade médica em formas eficientes de prevenção e diagnóstico. Neste trabalho buscou-se entender se há conexão entre dois fenótipos de determinação complexa: hipodontia e câncer. A odontogênese humana é resultado da expressão coordenada de mais de 300 genes, dentre os quais genes cujos produtos participam de vias metabólicas envolvidas em vários módulos biológicos. Diante de descrições na literatura de ocorrências de câncer e agenesia dentária, hipotetizou-se a possibilidade de haver associação entre agenesia dentária e marcadores genéticos descritos como associados a câncer de ovário - rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183- e desses mesmos marcadores com outros tipos de câncer. Foi conduzido um estudo de associação onde definiu-se como caso-controle i. mulheres com hipodontia e sem hipodontia e ii. mulheres com e sem histórico familiar de câncer. As frequências alélicas dos marcadores genéticos nessa população assemelha-se a de outras populações mundiais, cujos dados foram acessados a partir do banco de dados do *1000 Genomes Project* avaliados. As amostras dos grupos caso e controle são pertencentes à mesma grande população e não apresenta diferenças de frequências alélicas nem genotípicas. A análise de Odds Ratio mostrou não haver associação entre hipodontia e esses marcadores em uma amostra de 33 casos e 70 controles da população brasileira. Quanto a busca de associação entre os citados marcadores e câncer em geral, foi obtido um resultado limítrofe para o genótipo AA do marcador rs7576183 (OR=6,299, p=0,007 e IC=1,431 – 38,972). Esse resultado sugere que esse marcador genético possa também estar associado com outros tipos de cânceres, além do de ovário. Além da relação de marcadores bialélicos ao fenótipos complexo de câncer, a literatura também relata a associação de marcadores multialélicos do tipo variação no número de cópias (CNV) a vários fenótipos complexos, entre eles vários tipos de cânceres. Foi também realizada a análise cromossômica de microarranjos (CMA) na procura de CNVs no genoma de quatro pacientes com hipodontia e agenesia dentária familiar. Duas pacientes apresentaram resultados normais, enquanto duas pacientes, ambas afetadas por câncer, apresentaram resultados similares de duplicação na banda 10q11.22, a qual foi considerada possivelmente

patogênica. Uma área de 1,2 Mb de coincidência entre os achados citogenéticos foi determinada, que também se apresentou coincidente a um mapa genômico de agenesia dentária em população chinesa. Apesar dos fenótipos não serem possíveis de uma comparação detalhada por falta de descrição das pacientes na literatura, foi sugerido que o 1,2Mb na região 10q11.22 contém gene que participa da expressão do fenótipo de agenesia dentária. Além disso, dentre a lista de genes da área congruente, destacou-se o gene *LINC00842* como possivelmente participante da determinação fenotípica de hipodontia e câncer. Como conclusão do trabalho sugere-se que a estratégia de análise de CMA seja mais eficiente e viável para entendimento de fenótipos complexos que a análise caso-controle.

PALAVRAS-CHAVE: Hipodontia, CMA, Câncer, Fenótipos complexos.

ABSTRACT

Cancer is a complex inheritance disorder, with a variable death rate according to different types of the disease. In a general way, death rates has been increasing worldwide for the past few decades, therefore there is a great interest in medical field for more effective ways of prevention and diagnostics, which is key to fight this disease. We aimed to verify if there is a connection between two conditions of complex inheritance: dental agenesis and cancer. Human odontogenesis results from the coordinated expression of more than 300 genes, among which many are involved in considerable number of metabolic pathways important to several biological modules. The co-occurrence of dental agenesis and cancer was described previously in literature, suggesting a connection between hypodontia and epithelial ovarian cancer (EOC). Hence we hypothesized the possibility of existing association between previously EOC related markers – rs1516982, rs10088218, rs10098821 and rs7576183 – and hypodontia. A case-control study was conducted with i. women diagnosed with and without hypodontia and ii. women with and without cancer family history. The allelic frequencies found are similar to those described in other populations, accessed at 1000 Genomes Project. We have observed that samples from case and control groups belong to a single population, this way they don't show neither allelic, nor genotypic difference in frequency. Odds Ratio analysis showed no association between hypodontia and these genetic markers in a sample made of Brazilian women – 33 cases and 70 controls. We obtained a borderline result for AA genotype from rs7576183 and cancer family history (OR=6.299, $p=0.007$ e CI=1.431 – 38.972). This result suggests that rs7576183 may be associated with other types of cancers, beyond EOC. In addition to biallelic markers associated with complex phenotypes like cancer, literature also indicates that copy number variation (CNV) multiallelic markers could be related to several types of cancer. We performed chromosome analysis microarray to evaluate CNVs in four patients with hypodontia and family history of hypodontia. Two patients presented non-pathogenic results, while two patients presented the same possibly pathogenic duplication at 10q11.22 and both affected by cancer. We identified a 1,2 Mb coincidental area between the patients, which is also overlaps with genomic map of non-syndromic tooth agenesis in a Chinese population. Even though is not possible to compare the phenotypes in detail, we suggest that the gene involved in dental agenesis is located in the 1,2

Mb at 10q11.22 region. Furthermore, among the genes listed in the coincidental area LINC00842 is likely to take part in the phenotypic expression of dental agenesis and cancer. In conclusion, we believe that CMA analysis is more effective for understanding phenotype x genotype relationship than case-control strategies.

KEY WORDS: Hypodontia, CMA, cancer, complex phenotypes.

LISTA DE ABREVIATURAS

Água MiliQ – Água Ultrapura

ANX – *Annexin Family*

ANX8L1 – *Annexin A8 Like 1*

ANX8L2 – *Annexin A8 Like 2*

ANXA8 – *Annexin A8*

AXIN2 – *Axis Inhibitor Protein 2*

BAC – Cromossomo Artificial de Bactéria (*Bacterial Artificial Chromosome*)

BMP – Proteína Morfogenética Óssea (*Bone Morphogenetic Protein*)

BMS1L – *Ribosome Biogenesis Fator Family*

BP – *Breakpoint*

BRCA1 – *Breast Cancer 1*

CGH-array – Hibridação Genômica Comparativa (*Comparative Genome Hybridization*)

ChAS – *Chromosome Analysis Suite v33.1 Software*

CMA – Análise Cromossômica por Microarranjos

CNV – Variação de Número de Cópia (*Copy Number Variation*)

CO – Centro-Oeste

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

CTGLF – *Connective Tissue Growth Factor Family*

CTSLL – *Cathepsin L Family*

dbSNP – *Database of Short Genetic Variation*

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*

DF – Distrito Federal

DGV – *Database of Genomic Variation*

DH – Deficiência de Heterozigotos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOU – Diário Oficial da União

ECARUCA – *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGF – Fator de Crescimento Epitelial (*Epithelial Growth Factor*)

EH – Excesso de Heterozigotos

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

EOC – Câncer de Epitélio Ovariano

FAM25 – *Family with Sequence Similarity 25*

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factor*)

FISH – Hibridação *in situ* Fluorescente

FP – Fenda Palatina

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

Fst – Teste de Diferenciação Populacional

GDB – *The Human Genome Database*

GLUD – *Glutamate Dehydrogenase Family*

GO – Goiás

GPRIN2 – *G Protein Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 2*

HC – Histórico de Câncer

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IGRF2 – *Insulin Like Growth Factor II*

IMC – Índice de Massa Corporal

INCA – Instituto Nacional do Câncer

InDels – Inserções/Deleções

LINC00842 – *Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 842*

linnRNA – RNA integênico longo não codante

LOH – Perda de Heterozigose (*Loss of Heterozygosity*)

LP – Lábio Leporino

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MIC1R – *Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)*

MSX1 – *MSH Homeobox 1*

MYC – *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*

ncRNA – RNA não codante

NPYR4 – *Neuropeptide Y receptor Y4*

OMIM – *Online Medelian Inheritance in Man*

OR – Odds Ratio

PAX9 – *Paired Box 9*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTEN – *Phosphatase and Tensin Homolog*

RET – RET Proto-oncogene

rpm – Rotações por Minuto

RUNX2 – *Runt Related Transcription Factor 2*

SDS – Dodecil Sulfato De Sódio

SHH – (*Sonic Hedgehod*)

SNP – Polimorfismo de Ponto Único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SV – Rearranjos Cromossômicos Estruturais (*Structural Variation*)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE – Tampão de Eluição

TGF β – Fator de Transformação do Crescimento (*Transformation Growth Factor β*)

TP53 – *Tumor Protein 53*

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UPD – Dissomia Uniparental (*Uniparental Disomy*)

WNT – Proteínas da família *Wingless*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das fases de diferenciação tecidual e expressão gênica na odontogênese humana (adaptado de Bei, 2009).....	3
Figura 2. Resultado gráfico do cálculo de diferenciação populacional (F_{st}) realizado para os grupos caso e controle de estudo sobre hipodontia a partir dos dados dos marcadores genéticos rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183, na população feminina do Distrito Federal.	20
Figura 3. Heredograma da família I, sendo que a probanda está indicada pela seta.	33
Figura 4. Heredograma da família II, sendo que a probanda está indicada pela seta.	34
Figura 5. Heredograma da família III, sendo que a probanda está indicada pela seta.	35
Figura 6. Heredograma da família IV, sendo que a probanda está indicada pela seta.	36
Figura 7. Fluxograma resumido do protocolo de CMA da plataforma <i>Affymetrix® Cytoscan™</i> 750k array (modificado, <i>quick reference card affymetrix®</i>).	37
Figura 8. Esquema de nomenclatura baseado em <i>breakpoints</i> de sondas (bp) da região duplicada em 10q11.22.....	38
Figura 9. Resultado gráfico das alterações citogenéticas encontradas na região 10q11.22 em duas pacientes afetadas por agenesia dentária. As setas vermelhas indicam a alteração das probandas da família II e da família IV e os traços pontilhados destacam a região citogenética congruente para ambas as pacientes. As barras em tons de azul e vermelho são variações encontradas no banco fornecido pelo fabricante, tons mais escuros representam frequências maiores que as barras com tons mais claros (retirado e modificado do resultado do <i>software ChAS</i>).	43
Figura 10. Representação gráfica de achados citogenéticos da região 10q11.22, das probandas da família II e IV, de pacientes do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital de Apoio da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Os traços pontilhados identificam a região de congruência entre as duas pacientes deste estudo.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de agenesia dentária por região geográfica ou país e gênero. Entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança (IC 95%) (adaptado de Polder <i>et al.</i> 2004).	6
Tabela 2. Estudos de prevalência de hipodontia (dados retirados de Larmour <i>et al.</i> 2005; Gomes <i>et al.</i> 2010).	7
Tabela 3. Identificação, sequência e posição citogenética dos quatro marcadores genéticos analisados.	13
Tabela 4. Caracterização dos grupos caso e controle com relação ao histórico familiar de agenesia dentária e histórico familiar de câncer.	17
Tabela 5. Distribuição genotípica, frequência alélica e teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), teste para verificação de deficiência de heterozigotos (DH) e excesso de heterozigotos (EH) dos marcadores genéticos rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183 de uma população de mulheres brasileiras (n=103).	18
Tabela 6. Distribuição mundial da frequência do alelo mais comum dos marcadores genéticos rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183 (Dados obtidos do <i>1000 Genomes Project</i>).	19
Tabela 7. Frequência dos haplótipos obtidos utilizando três SNPs – rs1516982, rs10088218 e rs10098821 – em população brasileira e grupos caso e controle da característica hipodontia.	20
Tabela 8. Avaliação de associação por Odds Ratio entre hipodontia e genótipos de quatro SNPs situados em regiões genômicas previamente descritas como relacionadas a câncer de ovário e para haplótipos obtidos utilizando três deles – rs1516982, rs10088218 e rs10098821 – em uma população brasileira.	23
Tabela 9. Avaliação de associação por Odds Ratio entre histórico de câncer (HC) e genótipos de quatro SNPs situados em regiões genômicas previamente descritas como relacionadas a câncer de ovário e para haplótipos obtidos utilizando três desses – rs1516982, rs10088218 e rs10098821 - , em uma população brasileira.	25

Tabela 10. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família I. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.....	41
Tabela 11. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família II. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.....	42
Tabela 12. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família III. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.....	42
Tabela 13. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família IV. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.....	43
Tabela 14. Lista de genes encontrados na duplicação da região 10q11.22 coincidente entre as probandas da família II e IV.	xviii

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	18
CAPÍTULO 1:.....	3
INTRODUÇÃO	3
<i>Câncer de epitélio ovariano</i>	7
OBJETIVO GERAL.....	9
<i>Objetivos específicos:</i>	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
<i>Aspectos éticos</i>	10
<i>Amostra</i>	10
<i>Extração de DNA</i>	11
<i>Genotipagem dos SNPs com Tecnologia Fluorescente Taqman</i>	13
<i>Análises estatísticas</i>	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
CONCLUSÕES	26
CAPÍTULO 2:.....	27
INTRODUÇÃO	27
OBJETIVO GERAL.....	31
<i>Objetivos específicos:</i>	32
MATERIAL E MÉTODOS	32
<i>Seleção de Amostras</i>	32
<i>Família I</i>	32
<i>Família II</i>	34
<i>Família III</i>	34
<i>Família IV</i>	35
<i>Método de análise laboratorial</i>	36
<i>Análise de dados</i>	37
RESULTADOS	40
<i>Família I</i>	40

<i>Família II</i>	41
<i>Família III</i>	41
<i>Família IV</i>	42
<i>Busca dos microarranjos em 10q11.22 em banco de bancos</i>	43
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO 1	I
ANEXO 2	II
ANEXO 3	V
ANEXO 4	XII
ANEXO 5	XIV
ANEXO 6	XVIII

Introdução Geral

Poucas generalizações são possíveis de serem realizadas sobre o câncer, isso porque o que se chama de câncer é, na verdade, um conjunto de várias doenças. Além disso, dentro de cada um dos tipos de câncer há grande heterogeneidade clínica e, também, genética. Sabe-se que o câncer causa grande impacto na vida do indivíduo, de sua família e ao sistema de saúde público. De acordo com o informe sobre a estimativa da incidência de câncer no Brasil, dado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o próximo biênio 2016-2017, é esperada a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, sendo 420 mil de casos não-melanoma (INCA, 2016).

Ainda sobre o conjunto das diversas apresentações que o câncer pode assumir, é possível dizer que em um terço dos casos a doença poderia ser evitada. Sendo os cânceres doenças complexas, o desenvolvimento destes é modulado pela interação com o meio ambiente. Ou seja, o estilo de vida, como hábitos alimentares e tabagismo, pode alterar as chances de aparecimento da doença. Nos outros dois terços dos casos, o câncer não é completamente evitável, pois a herdabilidade é alta (INCA, 2016).

Outra consideração generalista sobre esse conjunto de doenças é que 60% dos cânceres, em suas diversas formas, são diagnosticados em estágio avançado da doença (INCA, 2016). Isso ocorre porque parte das ocorrências são de doenças inconspícuas, ou seja, doenças cujas progressão não possui sinais nem sintomas claros para a realização de diagnóstico rápido e/ou preciso. Diante disso, na prática clínica há uma grande demanda por marcadores clínicos, isto é, identificação de fenótipos que sejam sinais e sintomas indicadores ou associados a uma doença específica.

Tendo isso em mente, relacionar traços fenotípicos à predisposição genética já é rotina na prática clínica. Um exemplo de como um marcador clínico pode ser indicador de práticas específicas é a cor da pele do paciente. Sabe-se que pacientes de pele clara, por terem maior predisposição ao câncer de pele, devem usar protetor solar com fator de proteção mais alto e não tomar sol nos horários em que a incidência de radiação seja maior. Mais especificamente, portadores de mutações no gene *MIC1R*, por exemplo, apresentam ainda maior predisposição a câncer de pele do tipo melanoma, tendo que ampliar os cuidados e incluir o uso de protetor em

ambientes fechados que possuam luz branca forte (Rodriguez and Setaluri 2014). Em outro contexto similar, os portadores de mutação de ponto no gene *MTHFR* que utilizam dietas com baixa quantidade de ácido fólico tem maior propensão à câncer colorretal (Hunter 2005).

Desde 2008 há discussão sobre uma possível associação entre hipodontia e alguns tipos de câncer, entre eles cólonrretal e epitélio ovariano. Sabe-se que a agenesia dentária não-sindrômica é uma condição na qual o indivíduo não tem a formação de dentição, ou parte dela, podendo ocorrer tanto na dentição decídua, quanto na permanente ou ambas (Bei 2009). É uma condição com heterogeneidade fenotípica, em que a forma mais branda é caracterizada pela ausência de um ou poucos dentes e as mais graves, por ausência completa da arcada dentária, a anodontia, passando por todos os graus de variação. Hipodontia é o nome dado à ausência de um a seis dentes permanentes e é frequentemente associada a outros fenótipos (Larmour et al. 2005; Nieminen 2009). Exemplos incluem casos de síndromes craniofaciais, fendas palatinas e lábio leporino (OMIM #106600). Além disso, há descrição de agenesia associada a fenótipos de sistemas diferentes, como mutações no gene *AXIN2* que levam a agenesia severa de dentição permanente, assim como a predisposição ao câncer colorretal (Lammi et al. 2004). Outro exemplo, é a observação de que mulheres com câncer no epitélio ovariano (EOC) têm 8,1 vezes mais chances de apresentarem hipodontia (Chalothorn et al. 2008). Portanto, supõe-se que mutações que modifiquem a odontogênese, como, por exemplo, as que geram anomalias como a agenesia dentária, possam influenciar na manifestação de doenças complexas como o câncer.

Diante disso, neste trabalho procurou-se por marcadores clínicos que pudessem ser observados mesmo antes do aparecimento do câncer e optou-se por trabalhar com os fenótipos de hipodontia e histórico familiar de câncer. A hipótese aqui testada é que seja possível relacionar características fenotípicas complexas, como alterações na odontogênese, à predisposição ao câncer e, com isso, melhorar o diagnóstico precoce. Sendo assim, o objetivo geral é realizar a prospecção de características fenotípicas de identificação em idade jovem que possam estar associadas a suscetibilidade ao câncer. Para alcançar esse objetivo, foram realizadas duas abordagens principais que estão apresentadas em dois capítulos: capítulo 1) Genes de suscetibilidade ao câncer de epitélio ovariano estão envolvidos na odontogênese humana?; capítulo 2) Emprego de Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA) na identificação de genes candidatos a fenótipos complexos: agenesia dentária e câncer.

Capítulo 1:

Genes de suscetibilidade ao câncer no epitélio ovariano estão envolvidos na odontogênese humana?

Introdução

A odontogênese, formação do tecido dentário na fase embrionária, é fruto da expressão orquestrada de ao menos 300 genes (Tucker and Sharpe 2004). Em humanos, inicia-se no período pré-natal e se estende até aproximadamente aos 13 anos de idade, quando ocorre a formação da dentição adulta tardia, marcada pela formação dos germes dos terceiros molares. Dentes são apêndices epiteliais e durante seu desenvolvimento ocorre uma intensa troca de sinais entre epitélio e mesênquima, sendo que cada fase da diferenciação do tecido induz ao próximo estágio de desenvolvimento (Bailleul-Forestier et al. 2008). Estudos em modelos animais e em humanos já demonstraram que diversos genes são expressos em momentos específicos do período embrionário, organizando o processo de diferenciação de tecidos e morfologia da dentição. A Figura 1 ilustra, resumidamente, o processo da odontogênese e lista parte dos genes envolvidos em cada etapa do desenvolvimento.

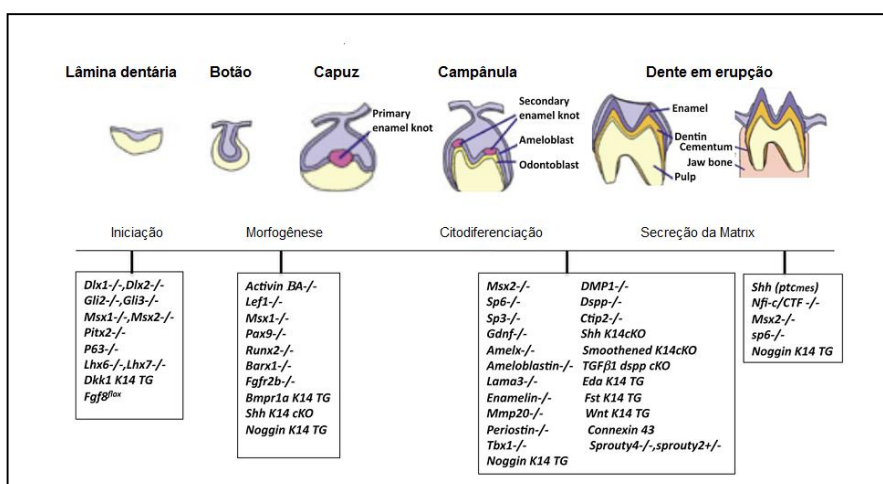


Figura 1. Representação das fases de diferenciação tecidual e expressão gênica na odontogênese humana (adaptado de Bei, 2009).

As interações entre células epiteliais e mesenquimais ocorrem por meio de diferentes moléculas de sinalização (Bailleul-Forestier et al. 2008). Dentre elas destacam-se: fator de transformação do crescimento (*TGFβ*), proteína morfogenética óssea (*BMP*), fator de crescimento fibroblástico (*FGF*), fator de crescimento epitelial (*EGF*), *hedgehog* (*SHH*) e as proteínas da família *wingless* (*WNT*) (Thesleff 2006). Dentre os genes relacionados com o processo do desenvolvimento dentário, acredita-se que muitos desempenhem funções importantes em tecidos e processos não ligados diretamente à dentição, especialmente aqueles que codificam fatores de transcrição, por exemplo, os genes *WNT* e o *Axis Inhibitor Protein 2* (*AXIN2*) (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>) (Thesleff 2003).

Com relação aos distúrbios da odontogênese, a agenesia dentária é a anomalia mais frequente (Larmour et al. 2005; Nieminen 2009). A agenesia é definida pela ausência natural de dentição decídua e/ou permanente e pode ser classificada, de acordo com o proposto por Nieminen (2009), em três categorias que refletem a gravidade do fenótipo: hipodontia, oligodontia e anodontia. Hipodontia é a ausência natural de um a seis dentes, enquanto a oligodontia ocorre quando não há formação de sete dentes ou mais. Já a anodontia é a ocorrência mais grave, na qual observa-se ausência total da dentição. Em todas as classificações encontradas na literatura, incluindo a de Nieminen (2009), é desconsiderada a ausência dos terceiros molares. Considera-se que os fatores que levam à agenesia de terceiros molares nas diferentes populações humanas são bastante variados e a frequência é elevada.

As bases genéticas da hipodontia ainda não estão completamente definidas (Nieminen 2009). Ela pode ser encontrada como fenótipo isolado ou associado a alguma síndrome, principalmente de mesma origem embrionária, como a Displasia Ectodérmica I (OMIM #305100). Ainda, comumente está associada a outros fenótipos, como fenda palatina, lábio leporino e outras malformações craniofaciais (OMIM #106600, OMIM #608874). A hipodontia não síndrômica é uma doença complexa, isso é, apresenta determinantes genéticos e ambientais, e, geralmente, apresenta padrão de herança autossômica dominante (OMIM #106600).

Vários estudos mostram que a prevalência da hipodontia é diferente de acordo com a população estudada. Por exemplo, nos países onde o acesso à saúde dental é facilitado, a prevalência é maior (Polder et al. 2004), possivelmente devido à melhor notificação. Contudo, isso não justifica diferenças de frequências entre países com o mesmo grau de acesso à saúde.

Um exemplo disso é a diferença da prevalência de hipodontia nos Estados Unidos (3,9%) e na Austrália (6,3%). Esse tipo de diferença provavelmente pode ser explicado pela história demográfica de cada população, dada por padrões de movimentos migratórios, padrão de reprodução da população e efeito fundador, que podem alterar frequências gênicas e genotípicas entre populações diferentes, ainda que não haja diferenças na qualidade de variabilidade genética (Bowcock et al. 1991). Por isso, a prevalência de doenças com determinantes genéticos pode seguir os mesmos padrões dados pela história demográfica. Dessa maneira, uma vez que a hipodontia é determinada por fatores genéticos, é razoável assumir que as diferenças nas frequências desses genes mostram, também, diferenças entre etnias e/ou ancestralidades.

A Tabela 1 (adaptada de Polder *et al.* 2004) mostra resultados de uma meta-análise de prevalência de agenesia dentária. Os valores mostram a variação de prevalência em diferentes populações. Apesar de os dados incluírem todos os diferentes tipos de agenesia (hipodontia, oligodontia e anodontia), de acordo com os autores, 83,0% dos pacientes desse estudo apresentam ausência de apenas um ou dois dentes (Polder et al. 2004).

Tabela 1. Prevalência de agenesia dentária por região geográfica ou país e gênero. Entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança (IC 95%) (adaptado de Polder *et al.* 2004).

Região geográfica / País	Homens (%)	Mulheres (%)	Total (%)
Europa	4,6 (4,5 - 4,8)	6,3 (6,1 - 6,5)	5,5 (5,3 - 5,6)
EUA (eurodescendentes)	3,2 (2,9 - 3,5)	4,6 (4,2 - 4,9)	3,9 (3,7 - 4,1)
EUA (afrodescendentes)	3,2 (2,2 - 4,1)	4,6 (3,5 - 5,8)	3,9 (3,1 - 4,6)
Austrália (eurodescendentes)	3,5 (4,4 - 6,6)	7,6 (6,0 - 9,2)	6,3 (5,4 - 7,2)
Arábia Saudita	2,7 (2,0 - 3,4)	2,2 (1,2 - 3,1)	2,5 (1,9 - 3,1)
China	6,1 (4,0 - 8,1)	7,7 (5,4 - 10,0)	6,9 (5,3 - 8,4)

Distribuição similar de hipodontia pode ser observada na Tabela 2, onde os dados de prevalência de agenesia está aliada à informação do tipo de dentição ausente. A frequência de hipodontia é baixa em determinadas populações, como, por exemplo, em populações árabes, onde a prevalência é de 2,6%, em contraste com populações europeias, que têm uma prevalência de até 11,3% (Larmour et al. 2005).

Tabela 2. Estudos de prevalência de hipodontia (dados retirados de Larmour *et al.* 2005; Gomes *et al.* 2010).

País	Prevalência (%)	Dente ausente mais frequente	Referência
Arábia Saudita**	2,6	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Salama and Abdel-Megid 1994)
Austrália*	6,3	Incisivo Lateral Maxilar Uni - e/ou Bilateral	(Lynham 1990)
Brasil*	6,3	Incisivo Lateral Maxilar Uni - e/ou Bilateral e/ou Incisivo Lateral Mandibular Uni - e/ou Bilateral	(Gomes et al. 2010)
Dinamarca*	7,8	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Rolling 1980)
Estados Unidos*	3,5	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Muller et al. 1970)
Hong Kong*	6,9	Incisivo Lateral Mandibular Uni - e/ou Bilateral	Davis, 1987
Inglaterra*	4,3	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Rose 1966)
Inglaterra**	4,4	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Brook 1974)
Irlanda*	11,3	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	O'Dowling et al., 1990
Islândia**	5,0	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Johannsdottir et al. 1997)
Malásia*	2,8	Incisivo Lateral Maxilar Uni - e/ou Bilateral	(Nik-Hussein 1989)
Noruega*	6,5	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Aasheim and Ogaard 1993)
Suécia*	7,4	Segundo Pré-Molar Mandibular Uni- e/ou Bilateral	(Bergstrom 1977)

*Estudos clínicos. **Estudos populacionais.

Como dito anteriormente, a hipodontia é frequentemente associada a diferentes fenótipos. Além disso, supõe-se que mutações capazes de modificar os genes que regulam a odontogênese como as que geram anomalias como a agenesia dentária, poderiam também ser responsáveis pela manifestação de fenótipos de outros módulos biológicos, caracterizando-se como genes pleiotrópicos. Estima-se, por exemplo, que certas mutações no gene *AXIN2* levam à agenesia de dentição permanente e severa, assim como a uma predisposição ao câncer colorretal (Lammi et al. 2004). Outro exemplo é a observação de que mulheres com câncer no epitélio ovariano (EOC) têm 8,1 vezes mais chances de apresentarem, também, hipodontia (ausência natural de 1 a 6 dentes) do que mulheres que não possuem EOC (Chalothorn et al. 2008; Kuchler et al. 2013). Esse estudo indica, potencialmente, um caso de pleiotropia, o qual

relaciona odontogênese e câncer. O câncer, em suas diversas formas, é uma doença complexa, portanto com contribuição de mais de um gene e padrão de herança heterogênea.

Ainda, um projeto em andamento de um grupo de pesquisa parceiro está buscando abordar a questão da pleiotropia entre fenótipos de módulos biológicos, no caso, a correlação entre odontogênese e câncer (Morford & Harstfield, comunicação pessoal). Os genes diretamente relacionados a odontogênese e câncer ainda não foram determinados. Contudo, em um estudo preliminar, foi observado que o nucleotídeo de base G do SNP rs10088218 aumenta em 11,51 o risco de hipodontia (Vu, comunicação pessoal) entre as pessoas com o alelo variante. Adicionalmente, SNP rs10088218 está situado em um gene descrito como candidato ao câncer de ovário (Gayther and Pharoah 2010).

Câncer de epitélio ovariano (OMIM #167000)

O maior conhecimento sobre as patologias, os fenômenos moleculares e a arquitetura genética poderá auxiliar de diversas formas na prática clínica. Por exemplo, no futuro, poderá ser possível identificar uma característica específica e, potencialmente, prever o aparecimento de uma doença. O câncer de epitélio ovariano, também denominado carcinoma de ovário, é a forma mais comum de câncer neste sítio anatômico. O carcinoma de ovário apresenta cinco subtipos histológicos: serosos, endometrioides, mucosos, de células claras e de células transicionais. Como não há sinais nem sintomas claros, é muito difícil a detecção do câncer de ovário nos estágios precoces, o que leva a um diagnóstico da doença em estágio avançado e consequentemente a prognósticos ruins (*American Cancer Society Website*, 2015). O carcinoma de ovário, no conjunto de suas apresentações, é considerado o mais letal entre as neoplasias do aparelho reprodutor feminino. Dados atualizados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer (2016) revelam que no ano de 2013 ocorreram 3283 óbitos por câncer de ovário no Brasil. Além disso, é esperado que no ano de 2016 sejam diagnosticados 6150 novos casos. No mundo, a estimativa é de que ocorram 200 mil novos casos por ano (INCA, 2016).

Apesar de não haver uma metodologia para o diagnóstico precoce desse tipo de câncer, o governo brasileiro publicou no Diário Oficial da União do dia 22/05/2012 a Portaria N° 458 que aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas para a neoplasia maligna epitelial de ovário. A

metodologia diagnóstica sugerida é a avaliação do antígeno de câncer 125 (CA-125) associada com ultrassom transvaginal (DOU, 2012). Porém, essa metodologia não tem mostrado eficácia na diminuição da mortalidade (Buys et al. 2011). Apesar disso, essa portaria deixa clara a preocupação com as mulheres acometidas por essa doença e esclarece a dificuldade de acesso ao diagnóstico precoce (DOU, 2012).

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama ou histórico de câncer de mama e/ou ovário familiar apresentam um risco elevado de desenvolver câncer de epitélio ovariano (*American Cancer Society Website*, 2015). Os diagnósticos de câncer do tipo colorretal hereditário não polipoide também estão relacionados com a maior predisposição à ocorrência de câncer de epitélio ovariano. A idade também é fator de risco, evidenciado pelo fato de que mais de 50% das mortes decorrentes de câncer de ovário ocorrem em mulheres que possuem entre 55 e 74 anos de idade (*American Cancer Society Website*, 2015). Mulheres que são inférteis e nulíparas, diagnosticadas com endometriose, aquelas que fazem reposição de estrógenos após a menopausa, aquelas com história de câncer familiar e obesidade também apresentam risco aumentado de desenvolver câncer de epitélio ovariano. Por outro lado, o uso de contraceptivos orais, amamentação, ligadura tubária e gestação têm um efeito protetor contra esse tipo de câncer (Calle et al. 2003; Ness et al. 2002; Whittemore et al. 1992; Zhou et al. 2008).

Apesar dos principais fatores de risco terem sido identificados, esses fatores por si só não têm sido capazes de atuar em favor do diagnóstico precoce de câncer de epitélio ovariano. O diagnóstico do câncer de ovário em estágios iniciais da doença é extremamente desafiadora, uma vez que, diferentemente de outros cânceres, como de pulmão, cabeça/pescoço ou pele, não há sintomas precoces consistentes, identificáveis ou confiáveis, nem marcadores diagnósticos eficientes. O tratamento para câncer de ovário tem uma taxa de 90% de sucesso quando a doença é diagnosticada no estágio I, mas essa taxa é de apenas 21% quando o diagnóstico é feito nos estágios III e IV. Estima-se que apenas em 23% dos casos de cânceres de ovário sejam diagnosticados no estágio I. Isso dá um resultado total de apenas 42% de sobrevivência nos cinco anos subsequentes (*American Cancer Society Website*, 2015).

A dificuldade no desenvolvimento de um método eficiente de exames para detecção de sintomas precoces resulta em uma taxa acima de 70% de mulheres sendo diagnosticadas em fase metastática (*American Cancer Society Website*, 2015). Até hoje, a causa do câncer de

epitélio ovariano permanece desconhecida. Contudo, a hipodontia pode ser diagnosticada nos primeiros anos da adolescência. Caso se confirme a relação entre hipodontia e risco aumentado de câncer, o diagnóstico da hipodontia poderá sinalizar que essas mulheres têm um risco maior de desenvolver câncer de epitélio ovariano. Sabendo disso, essas mulheres poderão estabelecer uma rotina de exames preventivos mais frequentes que as mulheres sem hipodontia. Dessa forma, o câncer de epitélio ovariano seria detectado precocemente, aumentando a probabilidade de sobrevivência da mulher afetada.

Neste trabalho busca-se identificar variações genéticas que possam conectar a hipodontia com outras condições médicas, com ênfase no câncer de epitélio ovariano, na tentativa de estabelecer uma conexão genética entre a ausência natural de dentes e outras condições clínicas. A variação genética poderá ser utilizada para identificar indivíduos que possuam um risco aumentado de desenvolver tais condições. Esses indivíduos poderiam então ser cuidadosamente monitorados, com exames regulares para detectar as condições em estágios iniciais, antecipando o tratamento, aumentando sua qualidade de vida, ou, ainda, salvando suas vidas.

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar se mutações descritas como relacionadas a câncer, em especial a câncer de epitélio ovariano, são mais frequentes em indivíduos com hipodontia.

Objetivos específicos:

1. Obter informações relativas ao estado geral do desenvolvimento dentário e médico em uma amostra de brasileiras acima de 18 anos de idade e descrever a prevalência de hipodontia nesta amostra;
2. Selecionar SNPs localizados em genes candidatos à suscetibilidade genética ao câncer de ovário;

3. Levantar a distribuição mundial de frequências alélicas dos SNPs nas populações analisada no *1000 Genomes Project*;
4. Analisar parâmetros de genética de populações;
5. Estimar frequência alélica e genotípica de SNPs localizados em genes candidatos à suscetibilidade genética ao câncer de ovário em grupos caso e controle de hipodontia;
6. Avaliar se os marcadores descritos para o câncer de ovário também apresentam associação com outros tipos de câncer.

Material e Métodos

Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em 09 de Junho de 2014, com número de parecer 676.577 (Anexo 1). Em adequação às normas estabelecidas pela CONEP, todos os sujeitos de pesquisa foram esclarecidos quanto ao conteúdo do projeto, assim como suas possíveis conclusões e consequências. Somente foram incluídos no projeto os indivíduos que concordaram com sua participação através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo 2).

Amostra

O conjunto amostral foi constituído de 103 amostras de indivíduos do sexo feminino, nascidas em território brasileiro, com idade acima de 18 anos e informações do histórico dentário. As voluntárias foram recrutadas na Clínica Machado Cruz, que fica no Lago Sul em Brasília/DF; na Clínica do Dr. Eduardo Khouri, em Goiânia/GO e mediante convites pessoais, com divulgação na Universidade de Brasília e redes sociais.

Foram realizadas entrevistas privadas com cada voluntária, durante as quais ocorreu o preenchimento e assinatura do TCLE, o preenchimento dos questionários e a coleta do material biológico. O questionário estruturado (Anexos 3 e 4) visou levantar dados quanto às condições odontológicas, uso de aparelhos ortodônticos e ocorrências de extração dentária, em especial

quanto à ausência natural de dentes permanentes. Também foi questionado sobre ocorrências de condições clínicas do sujeito, assim como de sua família, destacando-se ocorrências pessoais e familiares de câncer e de doenças auto-imunes. Assim como, ocorrências de determinados estilo de vida, como o tabagismo. Quanto ao histórico familiar, foram considerados histórico familiar de câncer positivo aqueles em que o indivíduo possuía dois ou mais parentes em 1º e/ou 2º grau que tivessem sido diagnosticados com algum tipo de câncer.

O diagnóstico de hipodontia e inclusão do sujeito na amostra foram feitos pela avaliação clínica e radiológica do paciente. O critério de diagnóstico para hipodontia foi a ausência de um a seis dentes permanentes, desde que se tenha certeza que a ausência foi natural e não por fatores externos, como, por exemplo: perda por trauma, extração ortodôntica ou doenças periodontais. Aquelas voluntárias que apresentaram dúvidas quanto à apresentação de displasias ectodérmicas, como má formação do crescimento de tecidos epiteliais, por exemplo, cabelos e unhas, foram retiradas da amostra.

O grupo controle foi composto por mulheres sem hipodontia. Esse grupo foi composto por mulheres não aparentadas entre si e que possuem dentição permanente completa, exceto pelos terceiros molares, que não foram considerados no estudo. Ainda, foram excluídas da amostra mulheres que apresentaram outras anomalias genéticas diagnosticadas, incluindo anomalias craniofaciais e displasias ectodérmicas.

Extração de DNA

A amostra biológica (sangue venoso periférico) foi coletada em tubo estéril à vácuo contendo EDTA como anticoagulante. A extração de DNA foi feita utilizando uma modificação do kit comercial Gentra Purigene Blood Kit – Qiagen® (Anexo 5). De acordo com esse método, o processo foi dividido em etapas. A primeira etapa foi a lise celular com 5mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8,0 em uma reação e 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra; para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Na segunda etapa, utilizou-se 1 mL da solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de NH₄ Ac. Centrifugou-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formaram um *pellet* marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo cônico contendo 3mL de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse um novelo de DNA. A reação foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 3mL de etanol absoluto. A reação foi novamente centrifugada. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescentou-se ao tubo com o DNA, 200-250 µL de TE 1x ou água milliQ, que resultou em uma concentração aproximada de 400 ng/µL. O DNA foi armazenado a 2-8°C. As quantificações foram feitas no espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific, EUA).

Marcadores Genéticos Selecionados

Foram analisados quatro marcadores genéticos do tipo SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) situados em *loci* descritos como relacionados à suscetibilidade genética ao câncer de ovário. Os genes e os SNPs correspondentes foram selecionados de bancos de dados com base na literatura científica, parâmetros de heterozigose e padrões de desequilíbrio de ligação. Os SNPs analisados nesse trabalho encontraram-se nos cromossomos 2 e 8, sendo que o rs7576183 situa-se na região citogenética 2q14.2 no gene *Activin-βB*, enquanto os demais SNPs, rs1516982, rs10088218 e rs10098821, situam-se na região 8q24.2 (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação, sequência e posição citogenética dos quatro marcadores genéticos analisados.

Marcador	Sequência	Posição citogenética
rs7576183	GTGGGGAGGAGTAGGGGAGTGGGGC[A/G]GAGAC AGGCATTGTGGAATGAACCA	Cr2:121,114,263
rs1516982	GTTTAACCCAGGACTTCTGTGGTAG[A/G]CAGTTTC TAAGATGGCCCTCAGTGA	Cr8:129,533,646
rs10088218	ACTGGGAGGAAGAAGGGAAAAGAAC[A/G]TTGACT GAGTGCCTACTATGCTTCC	Cr8:129,543,949
rs10098821	AGTTTTTAGATAGGGCACAAAAGA[C/T]GACATCA TAAAGTAAAGGATTAATA	Cr8:129,559,228

O gene *Activin-βB* é um gene pertencente à superfamília do fator transformador de crescimento (*TGFβ*). Essa família possui mais de 30 fatores de crescimento polipeptídeos, entre eles: *BMP* e fatores de crescimento e de diferenciação (Stenvers and Findlay 2010). De forma geral, essas proteínas participam da proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento e

angiogênese (Shelling 2012). Activinas são hormônios diméricos de glicoproteínas que agem na glândula pituitária e nas gônadas (Shelling, 2012), sendo importantes para a regulação do ciclo reprodutivo (Stenvers and Findlay 2010) e responsáveis por aumentar a biossíntese e secreção do hormônio FSH. Apresentam também funcionalidades relacionadas a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo, homeostase, resposta imune, regeneração e função endócrina (Chen et al. 2006). O gene *Activin-βB* também é expresso em outros tecidos, incluindo placenta, glândula pituitária, adrenais, baço, medula óssea e algumas regiões do cérebro (Luisi et al. 2001).

A região citogenética 8q24 é tradicionalmente considerada como um deserto gênico, no entanto, sempre foi bastante estudada devido à presença do proto-oncogene *MYC* (Huppi et al. 2012). Com a crescente discussão sobre novos conceitos de gene e estudos contínuos sobre a região, percebeu-se que a região apresenta grande atividade molecular, pois é alvo frequente de integrações virais, assim como *hot spot* de recombinação. Além disso, têm sido descritas variações associadas a vários tipos de câncer, como próstata, colorretal, mama, bexiga e ovário (Goode et al. 2010; Kiemeny et al. 2008; Yeager et al. 2009). No entanto, a variabilidade genética da região 8q24 não tem papel biológico bem estabelecido, e tem sido proposto que na verdade o “deserto gênico” é de fato uma região de grande complexidade transcricional (Huppi et al. 2012).

Genotipagem dos SNPs com Tecnologia Fluorescente Taqman

Para a análise dos SNPs foi utilizado o sistema Taqman® Genotyping Assay Kits (Life Technologies, EUA), que é um sistema de PCR tempo real validado pela própria empresa e analisado pelo equipamento StepOne (Life Technologies, EUA). Esse tipo de genotipagem, também conhecido como homogêneo, ou de tudo fechado, inclui componentes de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de genotipagem (Mamotte 2006). Os componentes da amplificação do material genético são os mesmos da PCR comum. O componente da genotipagem é a sonda específica que possui dois elementos fluorescentes, um fluoróforo e um *quencher*. O fluoróforo é ligado à extremidade 5' da sonda, enquanto o *quencher* é ligado à extremidade 3', sendo que enquanto a sonda estiver intacta nenhuma fluorescência será detectada pela máquina.

A reação de PCR em tempo real tem, além das mesmas etapas da PCR comum, duas etapas adicionais: a hibridação da sonda com o fragmento alvo e a detecção da fluorescência. A Figura 3 mostra algumas etapas fundamentais da PCR em tempo real, onde é possível ver que a sonda hibridiza somente ao SNP alvo. Durante a etapa de extensão, com o uso da enzima Taq DNA Polimerase ocorre o desligamento da sonda. Quando a sonda é desligada, ela se cliva liberando ambos os fluoróforos, que, quando separados, emitem sinal. O sinal dos diferentes fluoróforos é captado pela máquina de PCR em tempo real fornecendo a genotipagem do fragmento analisado. É importante lembrar que cada sonda tem um fluoróforo diferente. Sendo assim, um sinal forte do fluoróforo 1 identifica homozigose, sinais intermediários dos fluoróforos 1 e 2 identifica heterozigose e, por fim, um sinal forte do fluoróforo 2 identifica homozigose do segundo alelo.

Análise estatística

As análises estatísticas realizadas descrevem as amostras em agrupamentos diferentes. São elas: grupo amostral completo, grupo caso, grupo controle, grupo com histórico familiar de câncer e grupo sem histórico familiar de câncer. Primeiramente foram avaliados parâmetros de genética de populações. A aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e excesso e deficiência de heterozigotos, foram avaliados pelo *software* Genepop. Outros testes, como heterozigose média, desequilíbrio de ligação, inferência haplotípica e teste para diferenciação populacional (Fst), foram calculados utilizando-se o *software* Arlequin versão 3.5.2.2.

O estudo caso-controle foi realizado pela análise de associação estatística entre a distribuição dos marcadores genéticos e as condições clínicas para o qual foi realizado o teste de Odds Ratio pelo *software* R (Team 2015). O valor de significância (p) foi calculado utilizando-se o teste exato de Fisher. Foram realizadas duas distintas distribuições de amostragem: i. grupo caso/controle hipodontia; ii. grupo caso/controle histórico familiar de câncer. Para as análises de Odds Ratio foi empregada a correção de Bonferroni para o grau de significância especificado ($\alpha = 5\%$).

Resultados e Discussão

O universo amostral utilizado nesse trabalho foi composto de 103 amostras selecionadas a partir de um esforço de coleta composto por 127 probandas, pertencentes a 124 famílias diferentes. Dado o escopo do projeto, foram selecionadas para análise as mulheres sem relação genética familiar e com dados para os marcadores moleculares analisados. Desta forma, o grupo considerado para as análises foi formado por 103 amostras, destas 33 mulheres foram diagnosticadas com agenesia dentária, e por isso, incluídas no grupo caso. As demais 70 mulheres possuíam dentição permanente normal e foram incluídas no grupo controle. A média de idade das voluntárias foi de 31,8 anos (erro padrão = 9,6), sendo todas brasileiras.

Dezoito das 27 unidades da federação foram representadas com pelo menos uma amostra. A região geográfica mais amostrada foi o Centro-Oeste (CO), com 63 amostras (61,2%), seguido da região Sudeste com 22 coletas (21,3%). A região brasileira de menor representação na amostra foi a região Norte, com três amostras (2,9%). A super representação do Centro-Oeste se deve principalmente ao fato de que o estudo foi conduzido na Universidade de Brasília, que está localizada no CO. Atribui-se a grande contribuição da região Sudeste a dois fatores: essa é a região do Brasil com maior densidade populacional, e a taxa de migração dessa região para o DF sempre foi alta, em especial do Rio de Janeiro, estado onde a capital brasileira se situava. É interessante notar que tanto o DF, quanto a região Sudeste, já foram descritas na literatura como populações representativas da população brasileira, justamente devido às características únicas da história demográfica dessas regiões (Barcelos 2006).

As mulheres com agenesia dentária compreendem 33% da amostra. Percebe-se que o dado obtido não é comparável a frequência de agenesia previamente observada na população do Distrito Federal, pois o escopo do trabalho foi de caso-controle e houve enriquecimento da amostra pela busca ativa de mulheres com a característica. A prevalência de agenesia dentária para Brasília foi descrita em 6,3% da população geral (Gomes et al. 2010) e em 7,3% para a população feminina. Apesar do esforço de coleta ter sido para que a amostragem do presente estudo contivesse o maior número possível de amostras, verificou-se que as mulheres com dentição normal frequentemente não atendiam aos critérios de convite do estudo, principalmente

no que se refere à radiografia panorâmica. As sujeitas de pesquisa afetadas por agenesia, além de terem mais interesse na participação na pesquisa, possuíam documentação radiográfica. Desta forma, a proporção final entre amostras controle para amostras casos foi cerca de 2:1.

A média de dentição permanente ausente foi de 1,8 dentes (desvio padrão = 1,0). A maior frequência de ausência (12,5%) foi dos incisivos laterais maxilares de forma unilateral (dentes 12 ou 22), sendo que a ausência dos incisivos laterais maxilares de forma bilateral teve incidência 6,3%, dados concordantes com um estudo previamente realizado no DF (Gomes et al. 2010). Com frequências de 8,3% e 6,3%, respectivamente, observou-se ausência do segundo molar maxilar e mandibular de forma unilateral (dentes 27 e 37) e do segundo pré-molar mandibular de forma bilateral (dentes 37 e 47).

Além dos dados referentes à probanda, durante a entrevista foi questionado sobre o histórico de saúde familiar. Ao total foram coletados dados de 3323 indivíduos distribuídos nas 124 famílias em ao menos três gerações, caracterizando uma média de 25,2 indivíduos por família (erro padrão = 12,5). Das famílias selecionadas e incluídas no grupo controle, tem-se que 38,3% apresentam histórico familiar de câncer e 2,9% apresentam histórico familiar de agenesia. Uma única família apresenta histórico familiar de ambos os fenótipos (Tabela 4). Dentre as famílias incluídas no grupo caso, oito apresentaram histórico familiar de agenesia dentária, quatro com histórico familiar para câncer e seis famílias com ambos os históricos familiares positivos. Apenas uma única probanda apresentou agenesia dentária e câncer, especificamente, um adenocarcinoma de ovário. Nenhuma das mulheres incluídas no grupo controle tem, ou já teve, qualquer tipo de câncer.

Tabela 4. Caracterização dos grupos caso e controle com relação ao histórico familiar de agenesia dentária e histórico familiar de câncer.

Histórico familiar	Grupos	
	Controle n (%)	Caso n (%)
Famílias com histórico familiar de agenesia dentária	2 (2,86)	8 (24,24)
Famílias com histórico familiar de câncer	27 (38,57)	4 (12,12)
Famílias com histórico familiar de agenesia e câncer	1 (1,43)	6 (18,18)
Famílias sem histórico familiar de agenesia e câncer	40 (57,14)	15 (45,46)
Total	70 (100)	33 (100)

Sabe-se que os dados obtidos a partir do relato das probandas podem ser enviesados, mas há relatos na literatura de que há uma concordância de 77% entre o histórico de câncer relatado por familiares próximos e a realidade (Airewele et al. 1998). O estudo mostrou que a super representação de histórico de câncer ocorreu em apenas 2,9% da amostra, porém, cânceres em regiões pélvicas femininas foram os com menor concordância. Isso porquê houve confusão dos relatos familiares entre, por exemplo, câncer de útero e ovário (Airewele et al. 1998), mas ainda assim a concordância entre os relatos e os registros médicos estão acima de 50% das ocorrências.

Quanto aos marcadores genéticos, a distribuição dos alelos foi considerada aleatória, pois os quatro marcadores analisados se aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) quando considerou-se a amostra como um todo (n=100) (Tabela 5). Ainda, as frequências dos alelos estavam bastante próximas das frequências observadas em diferentes populações do mundo (Tabela 6).

O universo amostral conquistado não foi suficiente para que todos os genótipos de todos os marcadores fossem amostrados. Isso porque três dos quatro marcadores apresentaram um dos alelos com frequência muito baixa (variação aproximada de 6,9 a 15,1%, Tabela 5). Por exemplo, para o marcador rs1516982 não foi observado o genótipo GG no grupo caso, sendo que, o número esperado de indivíduos com esse genótipo seria de 1,3.

Tabela 5. Distribuição genotípica, frequência alélica e teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), teste para verificação de deficiência de heterozigotos (DH) e excesso de heterozigotos (EH) dos marcadores genéticos rs151698, rs10088218, rs1009882 e rs7576183 de uma população de mulheres brasileiras (n=103).

Locus	Alelos		Genótipos Observados			Genótipos Esperados			n	EHW		DH		EH	
	1	2	11	12	22	11	12	22		p	EP	p	EP	p	EP
rs1516982 A/G	0,849	0,151	68	27	1	69,2	24,6	2,2	96	0,691	0,002	0,919	0,002	0,329	0,003
rs10088218 A/G	0,127	0,873	-	26	76	1,7	22,7	77,7	102	0,357	0,002	1,000	0,000	0,163	0,002
rs10098821 C/T	0,931	0,069	88	14	-	88,5	13,0	0,5	102	1,000	0,000	1,000	0,000	0,623	0,003
rs7576183 A/G	0,380	0,620	12	52	36	14,4	47,1	38,4	100	0,390	0,004	0,884	0,003	0,219	0,005

Tabela 6. Distribuição mundial da frequência do alelo mais comum dos marcadores genéticos rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183 (Dados obtido do *1000 Genomes Project*).

Populações	rs1516982 A/G	rs10088218 G/A	rs10098821 C/T	rs7576183 G/A
Localização no cromossomo	8q24.2	8q24.2	8q24.2	2q14.1
Afro-americanos (EUA)	0,7869	0,8443	0,9426	0,6066
Afrodescendentes de Barbados	0,8281	0,8854	0,9896	0,6406
Bangladesh – Bengali	0,9070	0,9128	0,9709	0,6860
China - Dai	0,9624	1,0000	0,9946	0,8011
China – Han (Pequim)	0,9466	0,9806	0,9951	0,7476
China – Han (Sul)	0,9333	0,9905	0,9952	0,7429
China - Kinn	0,9293	0,9848	0,9848	0,7626
Colômbia	0,8670	0,8777	0,9043	0,5266
Espanha - Ibéricos	0,8364	0,8925	0,9019	0,5888
Finlândia	0,8737	0,8990	0,9141	0,6364
Gâmbia	0,8496	0,9027	0,9912	0,6593
Índia - Gujarati	0,8981	0,9272	0,9563	0,7621
Índia - Telugu	0,9069	0,8775	0,9461	0,7206
Itália - Toscana	0,8692	0,8879	0,9065	0,5654
Japão - Tóquio	0,9808	1,0000	1,0000	0,6731
Kênia - Luhya	0,7879	0,8737	0,9848	0,6465
Latino-Americanos de Los Angeles (EUA)	0,8594	0,9297	0,9609	0,6953
Nigéria - Esan	0,8182	0,8535	1,0000	0,6414
Nigéria - Yoruba	0,7917	0,8704	0,9907	0,6528
Pasquistão - Punjabi	0,8542	0,8698	0,9010	0,7448
Peru - Lima	0,9412	0,9824	0,9824	0,5765
Porto Rico	0,8606	0,8702	0,8942	0,6298
Reino Unido (britânicos)	0,8846	0,9176	0,9286	0,5958
Serra Leão	0,8706	0,9353	1,0000	0,6412
Sri Lanka	0,8873	0,8922	0,9608	0,7696
Utah - EUA	0,8434	0,8838	0,9040	0,5859

Os três marcadores situados no cromossomo 8 encontram-se em desequilíbrio de ligação nas três configurações amostrais (grupo completo, grupo controle de hipodontia e grupo caso de hipodontia). Isto era esperado, visto que esses três marcadores encontram-se na mesma região citogenética e com uma distância máxima de 25Kb (Tabela 3). No entanto, houve a detecção de um desequilíbrio de ligação entre o marcador rs10088218 e o marcador rs7576183 no grupo controle. Ainda que os marcadores estejam em cromossomos diferentes, esse tipo de

desequilíbrio de ligação já foi descrito na literatura (Pfaff et al. 2001). Isto é observado em populações com história de mistura recente, caso observado no Distrito Federal. De acordo com registros históricos, Brasília foi construída para ser capital federal e, durante os anos de obras e nos anos subsequentes, houve uma intensa migração de pessoas provenientes de várias regiões brasileiras à procura de oportunidade de emprego. Por isso, a população do DF é tida como uma população que reflete a variabilidade genética encontrada no Brasil (Barcelos 2006). Percebe-se também que em outros estudos descritivos sobre a população do DF, foram documentados desequilíbrios de ligação entre marcadores pertencentes a cromossomos diferentes (Godinho 2008; Gontijo 2008). Isso pode explicar a significância encontrada nos presentes dados, pois 61,1% da amostra é proveniente da região CO, onde o Distrito Federal se insere.

Diante do colocado, desconsiderou-se a ligação entre o SNP rs10088218 e o SNP rs7576183 que pode ser espúria e inferiu-se os haplótipos para os marcadores presentes no cromossomo 8. Quando considerado o grupo completo, foram encontrados os seis haplótipos possíveis, cujas frequências podem ser observadas na Tabela 7. O haplótipo GGT não foi observado na população controle, o que é atribuído a uma casualidade da amostragem, sem significância biológica, pois a frequência esperada para esse haplótipo nessa população é muito baixa. Além disso, as distribuições de frequência dos demais haplótipos estão concordantes entre si (Tabela 7). Por fim, ao avaliar a aderência de EHW dos três grupos amostrais quanto à distribuição haplotípica inferida, observou-se que a distribuição encontra-se ao acaso, portanto em equilíbrio, independente da configuração amostral testada.

Quanto aos demais parâmetros descritivos, como excesso e deficiência de heterozigotos e heterozigose média, tanto os marcadores considerados de forma independente quanto os haplótipos encontram-se dentro do esperado.

Tabela 7. Frequência dos haplótipos obtidos utilizando três SNPs - rs1516982, rs10088218 e rs10098821 – em população brasileira e grupos caso e controle da característica hipodontia.

Haplótipos	Amostra Completa (frequência \pm dp)	Grupo Controle (frequência \pm dp)	Grupo Caso (frequência \pm dp)
AAC - #1	0,0398 \pm 0,0135	0,0413 \pm 0,0168	0,0364 \pm 0,0232
AAT - #2	0,0236 \pm 0,0106	0,0278 \pm 0,0161	0,0143 \pm 0,0158
AGT - #3	0,0681 \pm 0,0200	0,0692 \pm 0,0209	0,0658 \pm 0,0328
GAC - #4	0,8075 \pm 0,0315	0,8047 \pm 0,0338	0,8135 \pm 0,0547
GAT - #5	0,0553 \pm 0,0179	0,0567 \pm 0,0212	0,0523 \pm 0,0311
GGT - #6	0,0055 \pm 0,0061	-	0,0174 \pm 0,0164

Em estudos de caso controle é importante verificar se as populações são pertencentes à mesma grande população. Nos estudos em que são utilizados indivíduos não relacionados, é possível que se tenha resultados falsos positivos gerados por estratificação populacional. A estratificação populacional é originada por dinâmicas populacionais, como a história demográfica da população e dinâmicas sociais internas, e pode criar um viés nos cálculos levando a resultados espúrios. É sabido que no Brasil a população é estratificada de diversas formas e isso é consequência da história de formação do país, pois o Brasil tem em sua população a contribuição genética de três populações formadoras: Africanos, Ameríndios e Europeus. Para avaliar esses fatos, os teste de estatística F (F_{st}) foram utilizados. Observou-se que as populações caso-controle são geneticamente provenientes de uma mesma grande população e verificou-se ausência de estratificação populacional para os dados (Figura 2).

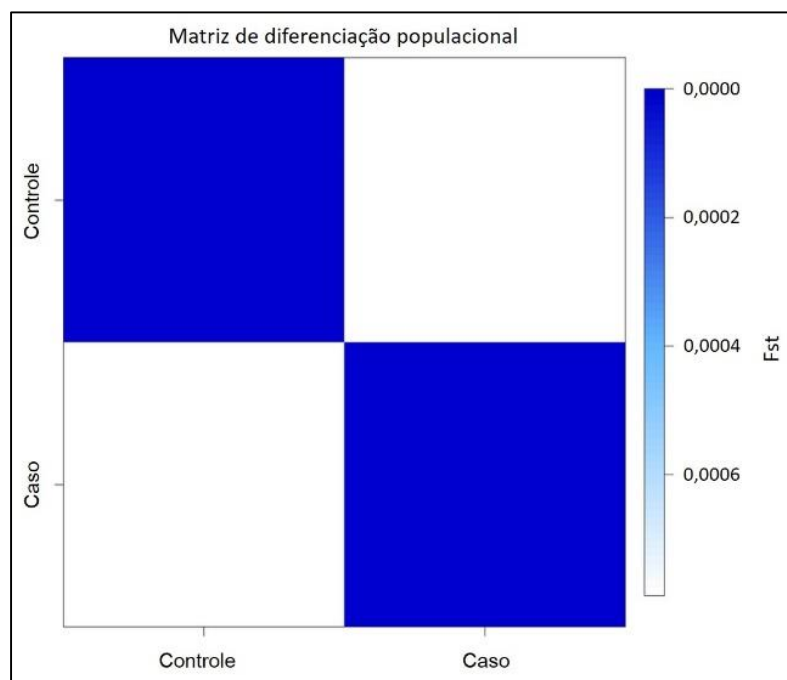


Figura 2. Resultado gráfico do cálculo de diferenciação populacional (F_{st}) realizado para os grupos caso e controle de estudo sobre hipodontia a partir dos dados dos marcadores genéticos rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183, na população feminina do Distrito Federal.

Com relação aos testes de associação realizados, nenhum dos marcadores de suscetibilidade ao câncer apresentou-se associado à agenesia dentária, como apresentados na Tabela 8. O teste realizado (Odds Ratio) é uma razão de probabilidades pareada. Desta forma, compara-se a probabilidade de um determinado genótipo ocorrer mais frequentemente em uma população do que outra. O que se percebe é que a distribuição dos genótipos não se mostrou mais frequente para nenhum dos grupos. Ou seja, dos testes realizados com os marcadores genéticos analisados, descritos na literatura como associados a câncer de ovário (Goode et al. 2010; Huppi et al. 2012; Shen et al. 2012; Zhao et al. 2012), não houve resultado indicativo de associação com hipodontia na presente amostra.

Outra discussão válida é sobre as estratégias de amostragem do presente trabalho em comparação ao trabalho de Chalothorn *et al.* (2008). Naquele estudo, verificou-se uma frequência de agenesia dentária aumentada a partir de uma amostra de mulheres com câncer de ovário, cuja média de idade era de 55,1 ($\pm 12,7$) anos. A amostra aqui avaliada apresentou média de idade de 31,8 ($\pm 9,6$). Desta forma, observou-se que maior parte da amostra estava fora da idade média de início de desenvolvimento desse câncer, que é a partir dos 55 anos de idade. Além disso, o trabalho de 2008 (Chalothorn et al. 2008) considerou todas as formas de agenesia dentária, ou seja, o espectro fenotípico abordado no trabalho engloba desde suas apresentações fenotípicas leves, como por exemplo a microdentição, até as apresentações mais graves, como a oligodontia. A amostragem realizada neste estudo tem um espectro fenotípico mais restritivo, uma vez que foram incluídas no grupo caso apenas mulheres diagnosticadas com hipodontia, ou seja, mulheres com ausência de dentição congênita de um a seis dentes permanentes.

Sabe-se que características fenotípicas semelhantes nem sempre são dadas por um genótipo comum. Isto ficou evidenciado em um trabalho de 2014 (Bonds et al. 2014) que complementou a análise realizada por Chalothorn *et al.* (2008). Em uma reanálise genética das mulheres com câncer de ovário que participaram do estudo de 2008, percebeu-se que parte das pacientes que tinham agenesia dentária e câncer de ovário tinham, de fato, causas independentes para os dois fenótipos (Bonds et al. 2014). No entanto, cinco pacientes não tiveram a etiologia genética de suas características estabelecidas. Além disso, outra parte das

Tabela 8. Avaliação de associação por Odds Ratio entre hipodontia e genótipos de quatro SNPs situados em regiões genômicas previamente descritas como relacionadas a câncer de ovário e para haplótipos obtidos utilizando três deles - rs1516982, rs10088218 e rs10098821 – em uma população brasileira.

	Caso	Controle			
rs1516982			OR	p	IC
AA	22	46	1,009	1,000	0,361 - 2,963
AG	9	18	1,067	1,000	0,361 - 3,000
GG	0	1			
n	31	65			
Frequência Alélica					
A	0,854	0,846			
G	0,146	0,154			
rs10088218			OR	p	IC
AA	0	0	NA	NA	NA
AG	7	19	0,710	0,628	0,222 - 2,059
GG	26	50	1,460	0,481	0,506 - 4,648
n	33	69			
Freq. alélica					
A	0,106	0,137			
G	0,894	0,863			
rs10098821			OR	p	IC
CC	27	61	0,972	1,000	0,260 - 4,079
CT	5	9	1,252	0,760	0,300 - 4,643
TT	0	0	NA	NA	NA
n	32	70			
Freq. alélica					
C	0,921	0,935			
T	0,079	0,065			
rs7576183			OR	p	IC
AA	3	9	0,680	0,746	0,110 - 3,00
AG	16	36	0,889	0,832	0,352 - 2,245
GG	13	23	1,334	0,512	0,509 - 3,451
n	32	68			
Freq. alélica					
A	0,343	0,397			
G	0,657	0,603			
Correção de Bonferroni				α	0,006
Haplótipos			OR	p	IC
0104	2	5	0,858	1,000	0,077 - 5,648
0204	1	4	0,529	1,000	0,010 - 5,664
0304	4	9	0,957	1,000	0,197 - 3,835
0404	19	41	1,010	1,000	0,379 - 2,776
0405	3	5	0,417	0,661	0,008 - 3,977
0406	1	0	NA	NA	NA
0505	0	1	NA	NA	NA
n	30	65			

	Caso	Controle
Freq. Haplotípica		
01	0,033	0,038
02	0,017	0,031
03	0,067	0,069
04	0,817	0,823
05	0,050	0,038
06	0,017	-
Correção de Bonferroni	α	0,01

mulheres apresentaram uma mutação no gene WNT10A, que seria o gene causador do fenótipo de agenesia dentária (Bonds et al. 2014). Tal *locus* foi identificado também como causador de agenesia de caninos maxilares (Kantaputra et al. 2014) e, ainda, descrito como associado a câncer colorretal (Galbraith et al. 2011).

É necessário averiguar, além da expressividade variável da agenesia dentária, a variação fenotípica que existe entre os diversos cânceres. Comparando-se os dados aqui obtidos e aqueles da literatura, observa-se que os parâmetros de tipo de agenesia dentária e histórico familiar de câncer não foram considerados com os mesmos critérios. No presente estudo, considerou-se um histórico familiar de câncer positivo para aquelas mulheres com pelo menos dois familiares, de até segundo grau, afetados por câncer. No trabalho de Chalothorn *et al.* (2008) não está claro o critério para determinação do histórico familiar de câncer. Adicionalmente, foi avaliado somente o histórico familiar de câncer de ovário. Portanto, não é claro se foi feita diferenciação entre câncer esporádico e hereditário. Outro trabalho mostra a associação entre agenesia dentária e histórico familiar de câncer autodeclarado (Kuchler et al. 2013). Nesse segundo caso, há similaridade de conduta com o trabalho aqui conduzido, contudo, os critérios para classificação de histórico familiar de câncer foram diferentes. No trabalho de 2013 (Kuchler et al. 2013) é considerado probando com histórico positivo de câncer familiar aquele que tiver ao menos um familiar, até segundo grau, com algum tipo de câncer.

Dessa forma, observa-se que os critérios utilizados no presente trabalho foram mais conservadores do que os descritos na literatura, o que pode levar a diferentes resultados. Por exemplo, como já colocado, a prevalência de câncer de ovário no Brasil é cerca de 6% de todas as ocorrências de câncer (INCA, 2016). Aqui observou-se que nos relatos de histórico familiar o câncer de ovário ocorreu em sete famílias diferentes das 33 famílias classificadas com histórico

familiar de câncer, dentre elas uma pertencente ao grupo caso. Isso é, a frequência desse tipo de câncer na amostra é de 21%, muito acima do descrito para a população brasileira. Contudo, esses dados não são de fato comparáveis, pois mesmo para a estimativa de prevalência nacional não são diferenciados os casos de cânceres familiares dos casos de cânceres esporádicos.

Os marcadores selecionados foram descritos na literatura em regiões genômicas de predisposição ao câncer, no caso, câncer de ovário. Um novo agrupamento da amostra visou analisar a ocorrência de associação entre os genótipos e haplótipos dos marcadores e câncer. Para tanto, a amostra foi dividida em indivíduos que apresentaram histórico familiar de câncer e os que não apresentaram histórico. Os resultados de Odds Ratio podem ser vistos na Tabela 9. O que se percebe é que o genótipo AA do marcador rs7576183 teve o maior resultado de OR. Contudo, quando aplicada a correção de Bonferroni, o novo valor de significância obtido é 0,006 e o valor observado para esse genótipo é de 0,0079, portanto não significativo. Porém, analisar de forma isolada a ausência de significância estatística seria uma imprudência. O que se observa é um valor estatístico limítrofe para um marcador que já foi descrito como associado à predisposição a câncer de ovário. Além disso, é necessário retomar que este é o único dos marcadores que está em região gênica e por isso, esse resultado pode estar refletindo uma significância biológica real. Sendo assim, sugere-se que o genótipo AA do marcador rs7576183 está relacionado não somente ao câncer de ovário, mas também ao histórico familiar de câncer positivo. Vale também resgatar a discussão sobre o esforço de coleta e a observação dos diferentes genótipos possíveis para os diferentes marcadores. O SNP rs7576183 foi o marcador cujo alelo de menor frequência se apresentou acima dos 30%, sendo, desta forma, o único marcador que, de fato, apresentou vários indivíduos com os três genótipos esperados para um marcador bialélico. Dessa forma, um universo amostral maior poderia modificar os resultados obtidos.

Tabela 9. Avaliação de associação por Odds Ratio entre histórico de câncer (HC) e genótipos de quatro SNPs situados em regiões genômicas previamente descritas como relacionadas a câncer de ovário e para haplótipos obtidos utilizando três desses - rs1516982, rs10088218 e rs10098821 – em uma população brasileira.

	HC negativo	HC positivo			
rs1516982			OR	p	IC
AA	41	27	1,183	0,819	0,437 – 3,34
AG	17	10	0,915	1,000	0,323 – 2,498
GG	1	0			
n	59	37			

	HC negativo	HC positivo			
Frequência Alélica					
A	0,838	0,864			
G	0,162	0,136			
rs10088218			OR	p	IC
AA	0	0			
AG	16	10	1,070	1,000	0,378 - 2,921
GG	48	28	0,933	1,000	0,342 - 2,639
n	64	38			
Frequência Alélica					
A	0,125	0,131			
G	0,875	0,869			
rs10098821			OR	p	IC
CC	56	32	1,517	0,742	0,333 - 9,505
CT	8	6	1,332	0,766	0,347 - 4,832
TT	0	0			
n	64	38			
Frequência Alélica					
C	0,937	0,921			
T	0,063	0,079			
rs7576183			OR	p	IC
AA	3	9	6,299	0,007	1,431 - 38,972
AG	36	16	0,574	0,216	0,231 - 1,401
GG	24	12	0,781	0,667	0,299 - 1,979
n	63	37			
Frequência Alélica					
A	0,333	0,459			
G	0,669	0,541			
Correção de Bonferroni			α	0,006	
Haplótipo			OR	p	IC
0104	4	3	1,188	1,000	0,164 - 7,504
0204	4	1	0,378	0,645	0,007 - 4,028
0304	7	6	1,404	0,559	0,354 - 5,393
0404	36	24	1,126	0,830	0,441 - 2,936
0405	5	3	0,935	1,000	0,136 - 5,173
0406	1	0			
0505	1	0			
n	58	37			
Frequência Haplótipica					
01	0,035	0,041			
02	0,035	0,013			
03	0,060	0,081			
04	0,801	0,824			
05	0,060	0,041			
06	0,009				
Correção de Bonferroni			α	0,001	

Conclusões

Os SNPs avaliados apresentaram frequências concordantes com outras populações mundiais. As amostras dos grupos caso e controle são pertencentes à mesma grande população e não apresentam diferenças de frequências alélicas nem genotípicas. Quanto aos resultados do teste de associação, não foi observada associação do fenótipo hipodontia e os genótipos dos quatro marcadores analisados neste trabalho (rs1516982, rs10088218, rs10098821 e rs7576183). Quanto ao histórico de saúde familiar, encontrou-se uma possível associação do marcador rs7576183 com o histórico familiar de câncer, independente do tipo de câncer apresentado pela família. Este marcador já foi descrito como associado ao câncer de ovário, mas diante dos resultados, ele deve ser investigado quanto a novos tipos de neoplasias.

Capítulo 2:

Emprego de Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA) na identificação de genes candidatos a fenótipos complexos: agenesia dentária e câncer

Introdução

Variações cromossômicas estruturais (SV – do inglês *Structural Variation*) são alterações que afetam a estrutura do cromossomo e podem ter como consequência a reestruturação genômica de forma balanceada ou não-balanceada, dados mostram que essas alterações representam cerca de 40% das alterações cromossômicas em recém-nascidos (Jacobs 1986). As alterações balanceadas são mais frequentemente vistas de forma balanceada e seus portadores não apresentam sinais ou sintomas clínicos, assim se apresentando como variabilidade genética não patogênica.

Entretanto, os portadores de rearranjos equilibrados possuem maior risco de formação de gametas com rearranjos estruturais não-balanceados. Isso se dá pelo possível malpareamento dos cromossomos homólogos durante a gametogênese. A falha na produção de gametas pode levar a abortos espontâneos, natimortos, ou prole apresentando sinais e sintomas clínicos. Alterações estruturais não-balanceadas são responsáveis por 3 a 6% dos abortos espontâneos recorrentes, aqueles caracterizados pela interrupção de duas ou mais gestações identificadas com batimento cardíaco fetal (Franssen et al. 2006; Goddijn and Leschot 2000). Dentre as morbidades causadas por alterações cromossômicas estruturais, há disfunções cognitivas, doenças do espectro autista (Ellison et al. 2012), anomalias congênitas múltiplas, dismorfias, problemas neurocomportamentais e suscetibilidade a câncer (van der Veken and Buijs 2011).

Os principais tipos de SVs não balanceadas são deleção e duplicação, que ampliam ou diminuem o conteúdo genômico. As duplicações se originam, na sua maioria, por recombinação homóloga não alélica (Bailey et al. 2002; Hurles 2005; Stankiewicz and Lupski 2002), isso é, recombinação entre regiões genômicas duplicadas com alta taxa de similaridade. Assim,

consideram-se duplicações os segmentos da sequência referência que apresentam ao menos 90% de similaridade com uma outra sequência em posição distinta do genoma (Bailey et al. 2002).

A gravidade do fenótipo produzido pelas SVs depende de determinados fatores, entre eles tipo, localização e tamanho. Nas deleções pode ocorrer perda de genes inteiros ou de parte deles. É comum nesses casos haver haploinsuficiência, fenômeno caracterizado pela redução na quantidade de produto gênico devido à perda de número de cópia do segmento. Em contraposição, a duplicação de genes inteiros pode causar hipersuficiência, caracterizada pela produção gênica exagerada dada pelo excesso de cópias funcionais. No caso das inversões e translocações, o quadro de leitura da sequência gênica envolvida na região do evento será alterada, seja por fusão gênica ou disrupção de sequência, apesar de o conteúdo genômico invertido ou translocado não se modificar.

O entendimento das SVs foi crescendo à medida que os métodos de visualização foram sendo implementados, desde as primeiras observações em microscopia de luz no início do século XX até o sequenciamento de genomas completos nos dias atuais. A microscopia por meio do bandejamento G utilizando preparações de cromossomos em metáfase permite a identificação de aberrações com tamanho mínimo de 5 a 10 Mb, sendo este o limite de visualização das alterações cromossômicas. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi o primeiro método que fusionou a citogenética às técnicas denominadas moleculares, pois faz uso de sondas específicas marcadas com fluorescência e possibilita um aumento de resolução na detecção de anomalias cromossômicas (Beaty et al. 2002).

Na citogenética, o fator limitante rotineiramente é o poder de resolução quanto ao tamanho das variações cromossômicas. Apesar de não haver ferramenta única capaz de descrever todo o espectro de variações estruturais no genoma (Zarrei et al. 2015). A resolução alcançada aumentou consideravelmente com a introdução da chamada Análise Cromossômica por Microarranjos (CMA). O CMA possibilita a identificação de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos submicroscópicos, aqueles que são menores que 5Mb, em todo o genoma. As primeiras versões da análise se utilizavam de sondas de cromossomo artificial de bactéria (BAC, do inglês – *Bacterial Artificial Chromosome*). As sondas específicas são desenhadas para se hibridarem a locais previamente conhecidos no genoma. Assim o resultado de grande qualidade

proveniente dessa técnica é dado pelo número de sondas e pela cobertura genômica, ou seja, o distanciamento entre elas. As técnicas mais modernas, derivadas do BAC, utilizam sondas de oligonucleotídeos, que são ainda mais exatas e diminuem a possibilidade de pareamento inespecífico por serem maiores. Além disso, a acuidade também aumenta, pelo menos, na ordem de mil vezes, já que o distanciamento das várias sondas fica abaixo dos 50pb. CMAs de oligonucleotídeos contêm sondas identificadoras de polimorfismos de evento único (SNP, do inglês – *Single Nucleotide Polimorphism*), a identificação de variações de número de cópias (CNVs, do inglês – *Copy Number Variation*), de perda de heterozigose (LOH, do inglês – *Loss of heterozygosity*) e de dissomia uniparental (UPD, do inglês *Uniparental disomy*).

CNVs são variações no número de cópias genômicas em decorrência de arranjos submicroscópicos não-balanceados, caracterizados por serem de tamanhos intermediários aos InDels (Inserções/Deleções) e pelas aberrações detectáveis pelo bandejamento G (Zarrei et al. 2015). Foram descritos apenas após a introdução das técnicas moleculares na citogenética. Assim como outras classes de marcadores, os CNVs se diferem entre indivíduos e populações. No entanto, o entendimento sobre essas diferenças ainda é restrito, as descrições básicas como o número de alelos diferentes e suas frequências nas diversas populações têm grande potencial de utilização em diversas áreas (Usher and McCarroll 2015). A grande aplicação dos CNVs tem sido na área de genética médica na busca de regiões genômicas associadas a patologias, mas outras áreas do conhecimento, como genética de populações, evolução humana e genética forense (Ilas *et al.* 2014), foram potencialmente beneficiadas com a descrição dessa nova variabilidade genética.

Os CNVs têm sido amplamente utilizados pela genética clínica como marcadores que permitem o diagnóstico de doenças do espectro de atraso de desenvolvimento mental, cognitivo e neuropsicomotor, dentre outros. O impacto de cada CNV no fenótipo do indivíduo é bastante variável. É consenso dizer que alterações localizadas em regiões de alta densidade gênica são mais prováveis de serem consideradas patogênicas (Miller et al. 2010). Isso porque há maior chance de que se corrompa algum gene ou a região regulatória de um gene. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para o tamanho do CNV, ou seja, quanto maior for a modificação, maior é a probabilidade de que ocorra algum prejuízo a algum gene (Miller et al. 2010). Ainda, especula-se que microdeleções podem ocasionar uma maior alteração fenotípica do que microduplicações.

As variações de número de cópia já foram caracterizadas como responsáveis por diferentes fenótipos complexos e associados a doenças de diferentes módulos biológicos, como, por exemplo, autismo (Pinto et al. 2014), esquizofrenia (Malhotra and Sebat 2012), doença de Crohn, artrite reumatoide, diabetes tipo I, obesidade (Craddock et al. 2010), vários distúrbios de desenvolvimento e câncer (Zarrei et al. 2015). Por isso sua análise apresenta potencial para entendimento de características de herança complexa. O CMA utiliza grande quantidade de sondas, o que lhe permite uma varredura genômica bastante completa. Isso o torna adequado para a análise de variações de distribuição ampla no genoma, como as CNVs. Portanto, essa é uma estratégia potencialmente útil na análise de genes candidatos e consequentemente na geração de informação pertinente para a caracterização de doenças complexas como o câncer.

Em 2006, foi demonstrado que 72% dos pacientes com leucemia mieloide crônica apresentaram CNVs na região 14q12 (Braude et al. 2006). Genes já bem conhecidos, como o BRCA1 (Gene *Breast Cancer 1*), foram associados à ocorrência de CNVs em pacientes com câncer de mama e em pacientes com câncer de mama e útero. Nesses casos, como o produto gênico de BRCA1 tem um papel importante na estabilidade genômica, mutações neste gene podem levar a uma perda de estabilidade e ao aumento na ocorrência de CNVs (Schouten et al. 2015). Por outro lado, um estudo brasileiro demonstrou que pacientes afetados por Síndrome de Li-Fraumeni não portadores de mutação no gene TP53 apresentam uma frequência aumentada de CNVs raros (Silva et al. 2014).

A frequência de CNVs ainda não foi extensamente caracterizada em termos populacionais e variações étnicas mas é possível afirmar que elas não são raras no genoma, incluindo regiões gênicas e extragênicas. As primeiras estimativas eram de que esse tipo de variação compreendia até 12% do genoma humano (Cho et al. 2006). Já as mais recentes estão entre 4,8 e 9,5% do genoma, dependendo do nível de restrição aplicada à análise (Zarrei et al. 2015). Em 2004 foi criado o banco de dados de variações genômicas (DGV, do inglês *Database of Genomic Variation*), base que contém informações sobre CNVs e outras variações em humanos numa população “controle”.

Ainda, é importante ressaltar que as variações de número de cópias já foram descritas em pacientes com más-formações craniofaciais (OMIM #183600) e em pacientes com fenda palatina e/ou lábio leporino (Osoegawa et al. 2008). Porém, até o momento não há literatura

relacionando CNVs e agenesia dentária não síndrômica, tanto pelo fato de que o exame de CMA é oneroso financeiramente ao paciente, quanto porque a agenesia dentária não síndrômica não oferece maiores prejuízos à qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Essas bases de dados fornecem informações preciosas sobre descrição de diversas variações. Contudo, não raramente, a caracterização da população pode ser dúbia. Isso porque um paciente pode ser considerado caso ou controle dependendo da pergunta do estudo, assim como pela anamnese que se escolhe realizar. Sendo assim, há uma lacuna para a interpretação desse tipo de dado. Por exemplo, a agenesia dentária não é uma característica avaliada rotineiramente, a não ser em sua apresentação mais grave, pois o impacto na qualidade de vida do indivíduo em caso de hipodontia é mais estético que funcional.

O que se percebe é que o ganho de resolução proporcionado pela técnica abriu um campo novo de informações a serem estudadas e caracterizadas. Apesar de técnicas de citogenética molecular baseadas em *arrays* estarem sendo usadas ao longo de quase duas décadas, é notável que as informações ainda sejam aparentemente subutilizadas, principalmente quanto às variações classificadas como não patogênicas observadas em pacientes. Há grande dificuldade na caracterização dos achados citogenéticos, pelos entraves em se relacionar genótipos e fenótipos complexos. Por isso, o emprego do CMA tradicionalmente é mais utilizado em genética clínica para diagnósticos de fenótipos aberrantes e síndromes genéticas cuja associação do genótipo e fenótipo pode ser feita de forma mais direta dada a clínica do paciente. Por isso, diante da grande variabilidade de CNVs e da grande quantidade de informações caracterizando essas variações, hipotetiza-se que haja CNVs descritos como não patogênicos que são indicativos de agenesia dentária.

Objetivo Geral

Avaliar a aplicação potencial da análise cromossômica de microarranjos na identificação de genes envolvidos no fenótipo de agenesia dentária familiar.

Objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar os rearranjos cromossômicos submicroscópicos encontrados pela análise cromossômica de microarray em quatro indivíduos com agenesia dentária familiar;
- Verificar se há rearranjos submicroscópicos coincidentes entre cromossomos de pacientes com agenesia dentária;
- Levantar a relação dos genes contidos nos microarranjos encontrados;
- Avaliar se há relação entre o quadro clínico das pacientes e a função já descrita para os genes.

Material e Métodos

Seleção de Amostras

Para a análise de CMA foram selecionadas quatro pacientes provenientes da amostra de mulheres brasileiras de estudo caso-controle acerca da ocorrência de SNPs nas regiões citogenéticas 2q14.2 e 8q24 e uma paciente proveniente de um laboratório parceiro. Os critérios para seleção das pacientes foram: i. ter diagnóstico de hipodontia, com exceção de terceiros molares; ii. ter histórico familiar de agenesia dentária com pelo menos dois familiares próximos afetados; iii. que não apresentassem outras má formações craniofaciais e/ou ósseas e iv. que não apresentassem nenhum sinal de displasia ectodérmica, como alterações de crescimento de tecidos epiteliais, por exemplo, cabelos e unhas.

Família I

A probanda, nascida em 1968, se declarou branca e possuiu IMC de 35,1 pontos, sendo classificada como obesa. Ela apresentava agenesia dentária dos quatro dentes do tipo segundo molares permanentes (os dois segundo molares superiores e os dois segundo molares inferiores, dentes 17, 27, 37 e 47), caracterizando um quadro clínico de hipodontia. Durante a anamnese declarou ter tido um episódio de aborto espontâneo e posteriormente, em 2006, um mioma uterino, motivo pelo qual realizou histerectomia.

A probanda relatou que na família I havia um total de seis pessoas afetadas com hipodontia, incluindo ela mesma. Desses casos, há comprovação clínica da probanda e dos indivíduos III.7, IV.1 e IV.3 que apresentaram agenesia dos segundos molares inferiores (dentes 37 e 47). Os outros dois indivíduos afetados no heredograma, II.7 e III.6 não possuíam comprovação radiológica. Contudo, foi relatado pela probanda que em ambos os casos haviam agenesia dentária de dois dentes permanentes (Figura 3). A probanda não soube dizer se houve ocorrência de agenesia de dentição decídua na família. Na linhagem paterna há histórico familiar de câncer, sendo três indivíduos do sexo masculino afetados por diferentes tipos da doença. Foi relatado que o indivíduo II.1 faleceu devido a um câncer, mas não foi especificado o tipo. No relato fornecido pela probanda consta que o indivíduo II.4 teve um câncer na jugular que o levou ao óbito e o indivíduo III.3 faleceu devido a um câncer no pulmão.

É possível notar no heredograma da família I que a condição de hipodontia apresenta um padrão de herança do tipo dominante ligada ao cromossomo X.

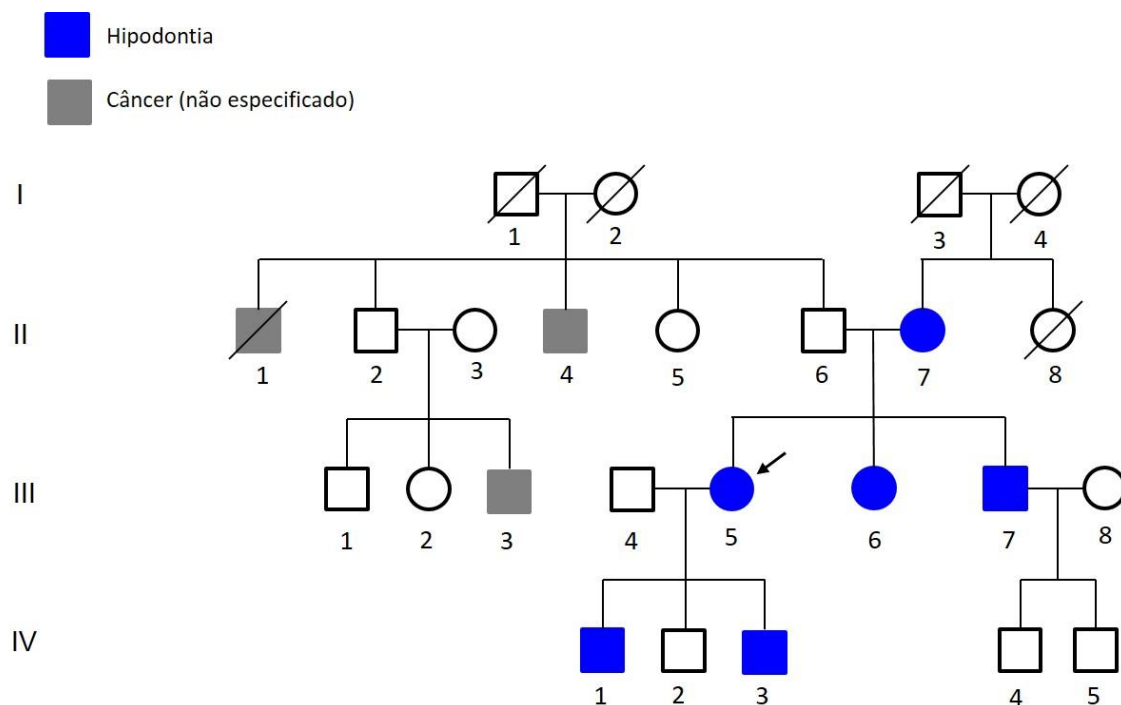


Figura 3. Heredograma da família I, sendo que a probanda está indicada pela seta.

Família II

A probanda nasceu na década de 1940 e possuía agenesia do incisivo lateral superior direito (dente 12) e desenvolveu adenocarcinoma de ovário. Foi relatado que nessa família havia indivíduos afetados por hipodontia distribuídos em duas gerações no heredograma, sendo eles a probanda, indivíduo III.4 e III.6 (Figura 4). Além disso, foi relatado um caso de microdentição (dentes conóides) dos incisivos laterais superiores (dentes 12 e 22) no indivíduo IV.4. A história familiar incluiu também a mãe da probanda (I.2) que faleceu devido a um câncer do trato digestivo, no entanto, para este caso não há comprovação médica. Apesar da família II ser bastante numerosa, foram acessadas informações exclusivamente sobre familiares próximos à probanda: duas gerações ascendentes diretas e duas gerações descendentes diretas, como colocado na Figura 6.

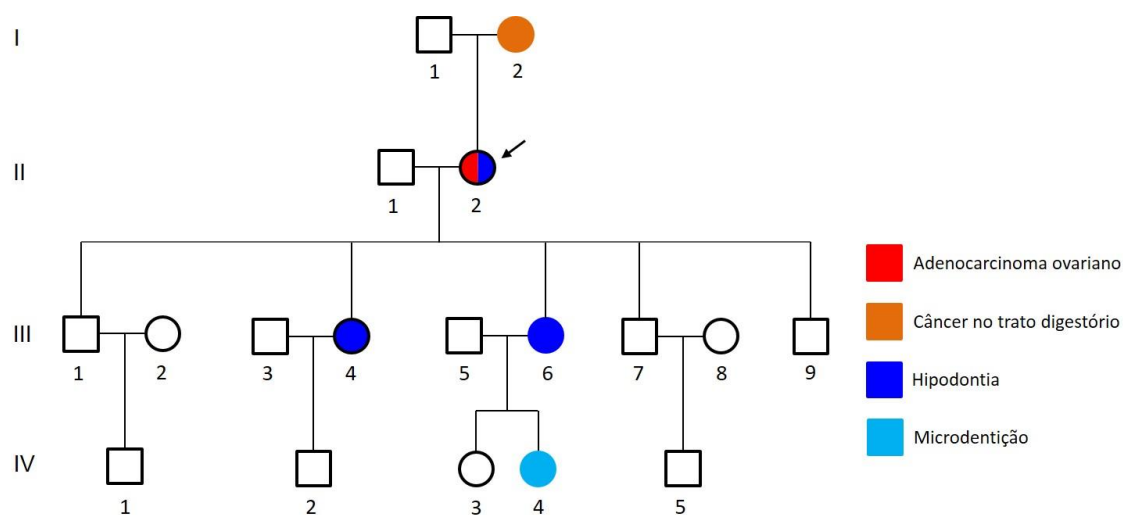


Figura 4. Heredograma da família II, sendo que a probanda está indicada pela seta.

Família III

A probanda, nascida em 1963, se autodeclarou branca e saudável e apresentava agenesia bilateral dos incisivos laterais superiores (dentes 12 e 22). Teve três gestações saudáveis e não relatou ocorrência de abortos ao longo da vida. Disse também que há menos de cinco anos teve cistos nos ovários, os quais a levaram ao procedimento de histerectomia e ooforectomia. A biópsia dos tecidos revelou resultados benignos.

A probanda relatou que na sua família havia quatro pessoas com hipodontia, sendo uma pessoa do sexo masculino (indivíduo I.1) e três do feminino (indivíduos, II.13, III.3 e III.18 - Figura 5). Ainda, foi relatado um caso de microdentição no indivíduo III.2. Por fim, no histórico familiar foi mencionado que o indivíduo II.5 faleceu devido a um câncer de intestino. Para este caso não há comprovação médica e devido ao fato de ser um relato único na família consideramos que na família III não há histórico familiar de câncer.

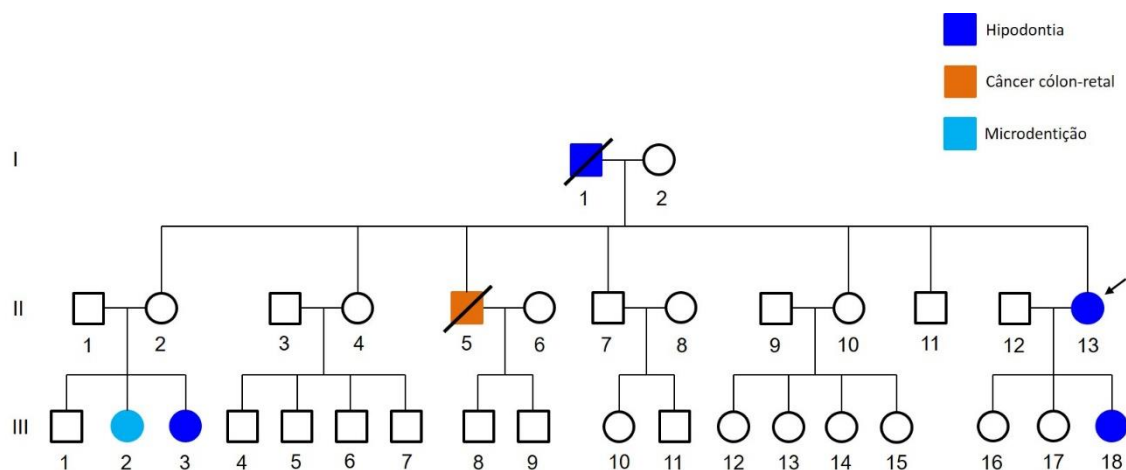


Figura 5. Heredograma da família III, sendo que a probanda está indicada pela seta.

Família IV

A probanda da família IV, falecida em 2009 devido a um câncer de colorretal, apresentava agenesia dos segundos molares do lado esquerdo, superior e inferior (dentes 15 e 45), assim como incisivos laterais superiores conóides (dentes 12 e 22). A família IV apresentou histórico de agenesia dentária nas apresentações do tipo hipodontia (indivíduos afetados II.3, II.11 e III.13) e oligodontia (Indivíduo afetado III.3) (Figura 6). Além disso, foi relatado pela família que o pai da paciente em questão (indivíduo I.1) também faleceu devido a um câncer intestinal.

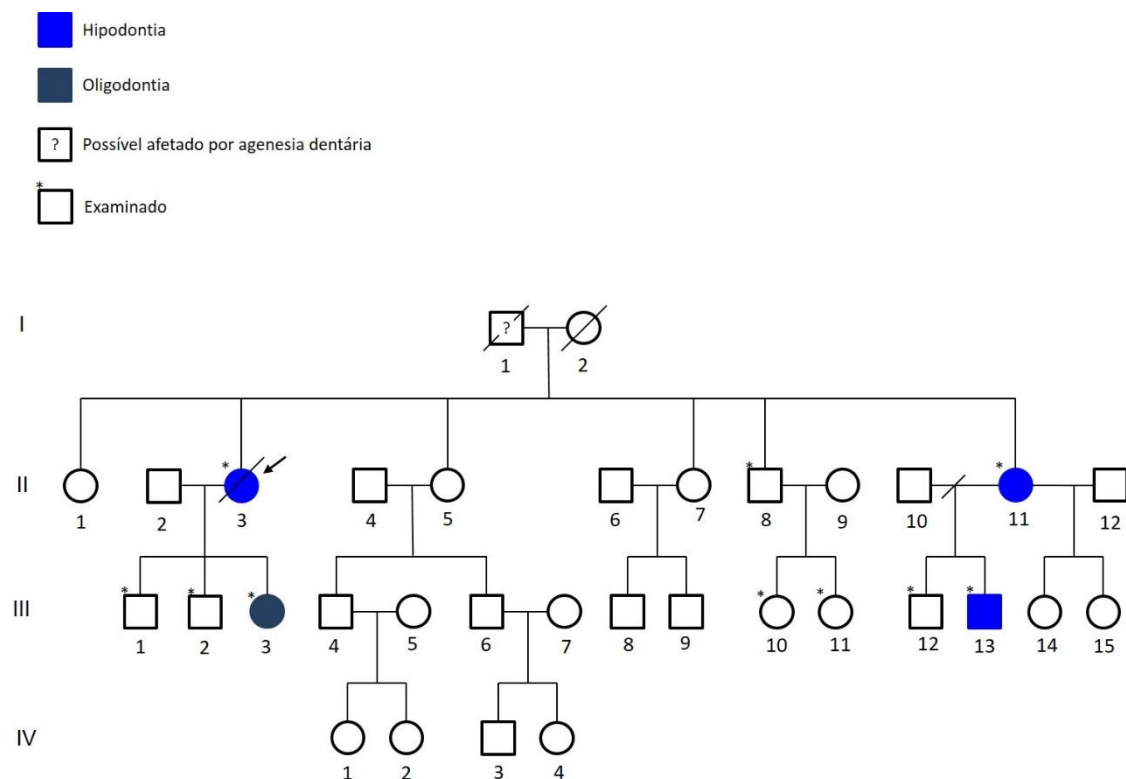


Figura 6. Heredograma da família IV, sendo que a probanda está indicada pela seta.

Método de análise laboratorial

O método de extração de DNA foi uma modificação do kit comercial Gentra Purigene Blood Kit – Qiagen[®] (conforme descrito no capítulo 1), feito a partir de sangue venoso coletado em tubo a vacuo contendo EDTA.

Para a análise de CMA foram utilizadas alíquotas de 5µL de DNA genômico na concentração de 50 ng/µL, isto é, um total de 250 ng de DNA por reação. Foi verificada a presença de microarranjos nas pacientes selecionadas utilizando a plataforma *CytoScan[®] 750K Array* (Affymetrix, EUA). Essa plataforma detecta microarranjos de DNA por meio de 550.000 sondas não polimórficas para CNVs (regiões codificantes e não codificantes), abrangendo todo o genoma numa distância média de 4.1 Kb. Além disso, a plataforma genotipa cerca de 200.000 SNPs. O sistema todo é constituído por um GeneChip[®], 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridação, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, além de um programa computacional específico para a identificação dos SNPs e das CNVs.

O protocolo foi seguido conforme instruções do fabricante (*Affymetrix*, EUA) e as etapas foram sumarizadas na Figura 7.

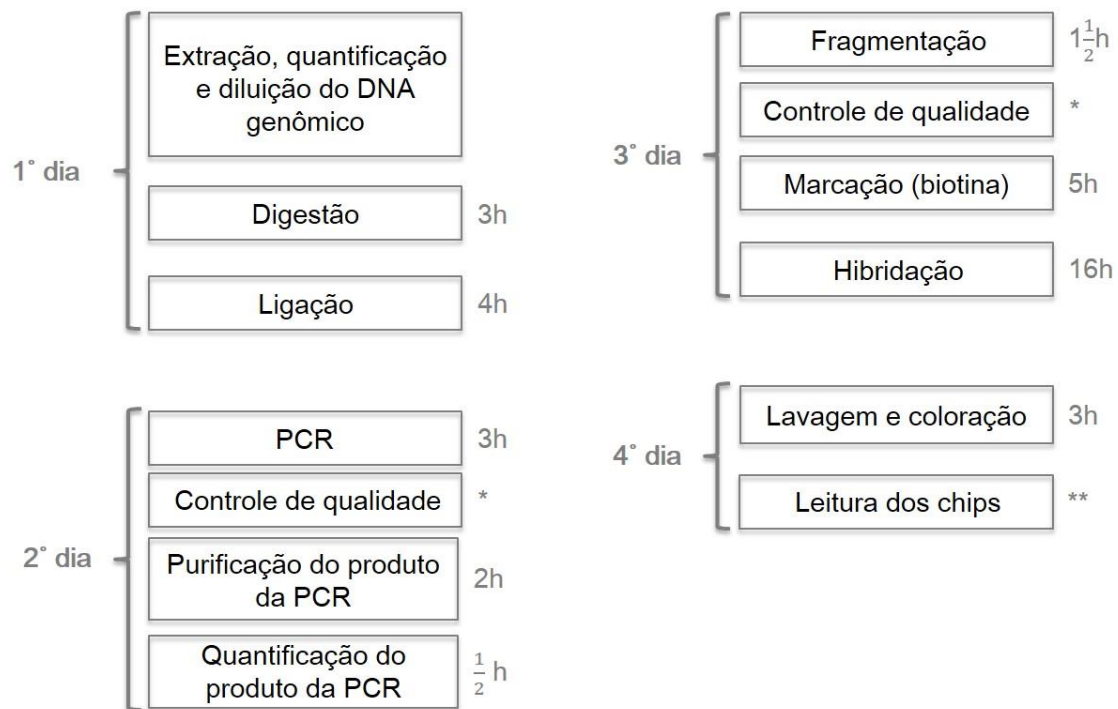


Figura 7. Fluxograma resumido do protocolo de CMA da plataforma *Affymetrix® CytoScan™ 750k Array* (modificado de *Quick reference card*, *Affymetrix®*).

Análise de dados

A análise dos dados gerados pelo CMA das quatro pacientes foi realizada com a utilização do *Chromosome Analysis Suite v33.1 Software* fornecido pela *Affymetrix®* (ChAS). Foram fixados como filtros: 30 sondas (aproximadamente 120 Kpb) para detectar duplicações cromossômicas, 15 sondas (aproximadamente 60 Kpb) para detectar deleções (inclusive em mosaico) e 5000 kb para perda de heterozigose. Esses filtros são os mesmos utilizados na rotina dos exames de diagnóstico no Laboratório de Genética Humana do Hospital Universitário de Brasília. O *software* apresenta um rigoroso controle de qualidade, incluindo filtragem de ruído formado pelas alterações encontradas em regiões cobertas por menos de 75% de sondas. Desta forma, os dados genômicos que falham nesse critério são excluídos da análise.

A plataforma possibilita analisar o número de cópias alelo-específicas, os SNPs, presentes permitem que ocorra a confirmação independente das variações de número de cópias

com informações alélicas de SNPs. As alterações são usualmente classificadas como patogênicas, possivelmente patogênicas, neutras ou de significado desconhecido (Miller et al. 2010). Para o presente trabalho foram coletadas informações quanto ao tipo (deleção ou duplicação), extensão da CNV, número de cópias envolvidas, cromossomo e banda cromossômica, tamanho e número de marcadores e genes envolvidos nas alterações.

Para melhor entendimento das alterações cromossômicas que foram encontradas, adotou-se uma classificação para que houvesse uma padronização quanto ao tamanho, a suas posições relativas umas às outras, e aos intervalos de ausência de sondas. A nomenclatura e os diferentes pontos do segmento podem ser verificados na Figura 8. As setas indicam os pontos onde a maioria das duplicações começavam e/ou terminavam, totalizando cinco pontos diferentes. A nomenclatura começa em BP1 e vai até BP5, seguindo o sentido cromossômico proximal-distal. Os segmentos em azul são regiões cromossômicas que são mapeadas por sondas na plataforma utilizada. Já as regiões achuradas, são regiões de DNA repetitivo que não contêm sondas.



Figura 8. Esquema de nomenclatura baseado em *Breakpoints* de sondas (BP) da região duplicada em 10q11.22.

Para a interpretação dos dados foram levadas em consideração as informações descritas em diferentes bancos de dados genômicos sobre polimorfismos genéticos: *dbSNP – Database of Short Genetic Variation* (Sherry et al. 2001), *DECIPHER - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (Firth et al. 2009), *OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man* (Amberger et al. 2015). O primeiro banco utilizado na averiguação da significância clínica do CNV observado foi o DECIPHER, banco composto por indivíduos com síndromes genéticas. Além dele, os achados foram contrastados com um banco

fornecido pelo fabricante da plataforma utilizada, formado por 2421 pessoas fenotipicamente normais de seis países diferentes: Canadá, Espanha, Estados Unidos, Holanda, Noruega e Suécia.

A verificação quanto à patogenicidade também foi investigada no banco de resultados de CMA produzidos no Laboratório de Genética Humana da Universidade de Brasília. O banco é composto por 558 amostras diversas, como, por exemplo, pacientes portadores de síndromes genéticas, pais de pacientes e amostras de tecidos (tumores). As amostras foram provenientes do consultório de aconselhamento genético do HUB (Hospital da Universidade de Brasília), Hospital de Apoio da Secretaria de Saúde do Distrito Federal e Hospitais parceiros.

Resultados

Família I

Seguindo o protocolo de genética médica, a probanda da família I apresentou variações não patogênicas de acordo com os bancos de dados utilizados. Ainda, dentre as variantes não havia nenhuma que tivesse relação descrita com a condição de hipodontia. A Tabela 10 apresenta os CNVs encontrados.

Tabela 10. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família I. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.

Tipo de alteração	Localização	Tamanho (kb)	Genes na região
Duplicação	10q26.3	1101,25	<i>EBF3</i> (607407), <i>LOC387723</i> , <i>CTAGE7P</i> , <i>GLRX3</i> (612754), <i>MIR378C</i>
	14q32.33	279,391	<i>KIAA0125</i> , <i>ADAM6</i>
	16q11.2	336,44	<i>LOC283914</i> , <i>LOC146481</i> , <i>LOC100130700</i>
Deleção	8p11.22	158,608	<i>ADAM5P</i> , <i>ADAM3A</i>
	10q23.33	127,064	<i>CYP2C19</i> (124020), <i>CYP2C9</i> (601130)
	11q11	73,528	<i>OR4P4</i> , <i>OR4S2</i> , <i>OR4C6</i>
	14q11.2	316,385	

Família II

O caso índice da família II apresentou uma duplicação na região citogenética 10q11.22 de aproximadamente 1,8 Mb de tamanho e que foi considerada possivelmente patogênica (Tabela 11).

Tabela 11. Descrição resumida dos microarranjos encontrados na probanda da Família II. Os números em parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.

Tipo de alteração	Localização	Tamanho (kb)	Genes na região
Duplicação	3q27.2	213,564	<i>EHHADH</i> (607037), <i>MAP3K13</i> (604915)
	10q11.22	1873,963	<i>AGAP4</i> , <i>PTPN20A</i> , <i>PTPN20B</i> , <i>BMS1P5</i> , <i>BMS1P1</i> , <i>GLUD1P7</i> , <i>FAM35B</i> , <i>SYT15</i> (608081), <i>GPRIN2</i> (611240), <i>PPYR1</i> (601790), <i>LOC643650</i> , <i>LOC728643</i> , <i>ANXA8</i> , <i>ANXA8L1</i> , <i>FAM25B</i> , <i>FAM25G</i> , <i>FAM25C</i> , <i>AGAP9</i> , <i>BMS1P6</i> , <i>BMS1P2</i> , <i>FAM35B2</i> , <i>ANTXRL</i> , <i>ANXA8L2</i> , <i>FAM21B</i> , <i>CTSL1P2</i>
	11q25	369,11	<i>LOC283177</i>
	14q32.3	268,655	<i>KIAA0125</i> , <i>ADAM6</i>
Deleção	6p25.3	126,883	<i>DUSP22</i>
	22q11.21	23, 294	<i>TBX1</i> (602054), <i>GNB1L</i> (610778)

Família III

O caso índice da família III apresentou como resultado variações não patogênicas. A lista dos achados citogenéticos pode ser verificada na Tabela 12.

Tabela 12. Descrição resumida dos microarranjos encontrados no caso índice da Família III. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.

Tipo de alteração	Localização	Tamanho (kb)	Genes na região
Duplicação	8p11.1	3736.906	--
	14q32.33	625.286	<i>KIAA0125</i> , <i>ADAM6</i> , <i>LINC00226</i>
Deleção	3q26.31	168.612	<i>NAALADL2</i> (608806), <i>MIR4789</i>

Família IV

Como resultado, a probanda da família IV apresentou, em sua maioria, variações não patogênicas. Contudo, destaca-se uma duplicação possivelmente patogênica no braço longo do cromossomo 10, banda 11.22. As alterações podem ser vistas na Tabela 13.

Tabela 13. Descrição resumida dos microarranjos encontrados no caso índice da família IV. Os números entre parênteses são os identificadores dos genes no banco de dados OMIM.

Tipo de alteração	Localização	Tamanho (kb)	Genes na região
Duplicação	9p13.3	178	<i>UBAP1</i> (609787), <i>KIF24</i> (613747), <i>NUDT2</i> (602852), <i>KIAA1161</i> , <i>C9orf24</i>
	10q11.22	1324	<i>GPRIN2</i> (611240), <i>NPY4R</i> (601790), <i>LINC00842</i> , <i>HNRNPA1P33</i> , <i>ANXA8</i> (602396), <i>ANXA8L1</i> , <i>FAM25C</i> , <i>FAM25B</i> , <i>FAM25G</i> , <i>AGAP9</i> , <i>BMS1P2</i> , <i>BMS1P6</i> , <i>FAM35DP</i> , <i>ANXA8L2</i> , <i>FAM21B</i> , <i>CTSL1P2</i>
	14q32.33	524	<i>KIAA0125</i> , <i>ADAM6</i> , <i>LINC00226</i>
	22q11.2	261	<i>MIR650</i> , <i>IGLL5</i>
Deleção	11q11	67	<i>OR4P4</i> , <i>OR4S2</i> , <i>OR4C6</i>
	18q22.3	51	
Perda de heterozigose	Xq22.2	5569	<i>MORF4L2</i> (300409), <i>MORF4L2-AS1</i> , <i>GLRA4</i> , <i>TMEM31</i> , <i>PLP1</i> (300401), <i>RAB9B</i> (300285), <i>MIR1256</i> , <i>TMSB15B</i> , <i>H2BFXP</i> , <i>H2BFWT</i> (300507), <i>H2BFM</i> , <i>SLC25A53</i> , <i>ZCCHC18</i> , <i>LOC286437</i> , <i>FAM199X</i> , <i>ESX1</i> (300154), <i>IL1RAPL2</i> (300277), <i>TEX13A</i> (300312), <i>NRK</i> (300791), <i>SERPINA7</i> (314200), <i>MUM1L1</i> , <i>CXorf57</i> , <i>RNF128</i> (300439), <i>TBC1D8B</i> , <i>RIPPLY1</i> (300575), <i>CLDN2</i> (300520), <i>MORC4</i> , <i>RBM41</i> , <i>NUP62CL</i> , <i>PIH1D3</i> , <i>PRPS1</i> (311850), <i>TSC22D3</i> (300506), <i>MID2</i> (300204), <i>TEX13B</i> (300313), <i>VSIG1</i> (300620), <i>PSMD10</i> , <i>ATG4A</i> (300663), <i>COL4A6</i> (303631), <i>COL4A5</i> (303630), <i>IRS4</i> (603510)

Busca dos microarranjos em 10q11.22 em banco de bancos

Dentre os diversos CNVs encontrados nas quatro pacientes, destacam-se os da região 10q11.22 (Figura 9), que foi observada em duas amostras. Além disso, há descrição no banco de dados OMIM de que essa região integra um mapa genômico associado à agenesia dentária (Liu et al. 2001; Wang et al. 2000). Contudo, esse mapa foi definido estatisticamente em uma população chinesa e não existem outros relatos similares na literatura. Desta forma, elegeu-se essa região para uma investigação mais aprofundada.

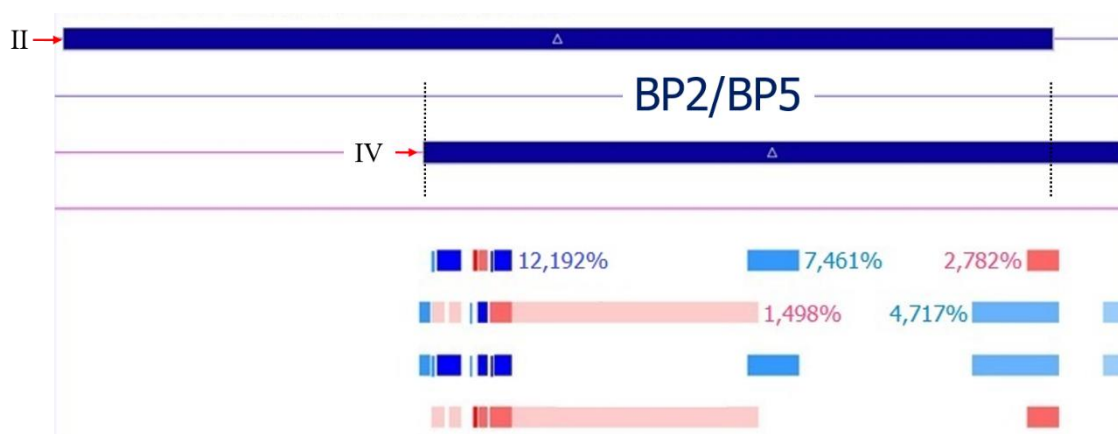


Figura 9. Resultado gráfico das alterações citogenéticas encontradas na região 10q11.22 em duas pacientes afetadas por agenesia dentária. As setas vermelhas indicam a alteração das probandas da família II e da família IV e os traços pontilhados destacam a região citogenética congruente para ambas as pacientes. As barras em tons de azul e vermelho são variações encontradas no banco fornecido pelo fabricante, tons mais escuros representam frequências maiores que as barras com tons mais claros (retirado do resultado do *software ChAS*).

A Figura 8 apresenta o esquema de *breakpoints* utilizado para categorizar as duplicações. A probanda da família II possui uma duplicação do tipo BP1/BP5, enquanto o caso índice da família IV possui uma duplicação BP2/BP5. Portanto, a área congruente entre as amostras é caracterizada como sendo BP2 e BP5.

Para uma ampla caracterização da duplicação em 10q11.22, foi investigada a ocorrência de duplicações nesta localização em vários bancos de dados. Primeiramente, foram caracterizadas as amostras presentes no banco de resultados de CMA do Laboratório de Genética Humana da UnB, entre as quais verificou-se a ocorrência de 23 amostras com duplicações em 10q11.22. Assim, foi observado que a frequência da duplicação BP2/BP5 foi de

0,89%. Já no banco de dados fornecido pela *Affymetrix*, não houve ocorrências exatas para a área correspondente entre BP2/BP5 (Figura 9). Há ocorrências de regiões menores, cujos tamanhos variam de 5 kb a 166 kb, tamanhos que diferem substancialmente da área de interesse da análise, que é de aproximadamente 1,2 Mb. As frequências dos fragmentos no banco da *Affymetrix* variaram de 4,71% a 11,62%. Das 22 ocorrências de duplicações em 10q11.22, observa-se que há cinco ocorrências que apresentam alterações citogenéticas exatamente no intervalo coincidente, excluindo as probandas (Figura 10).

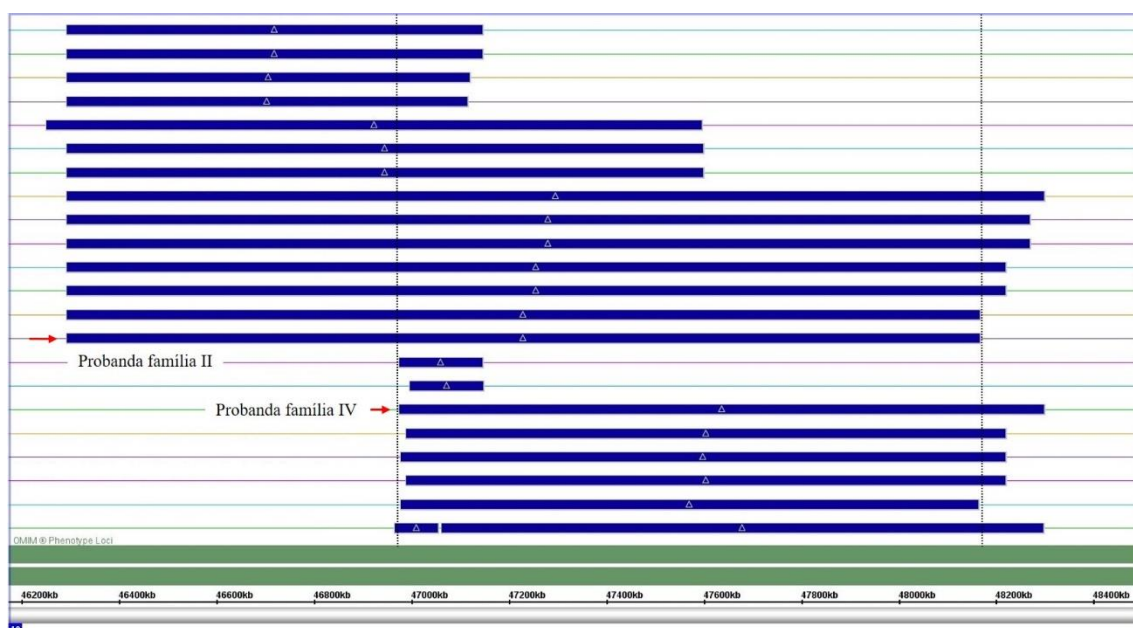


Figura 10. Representação gráfica de achados citogenéticos da região 10q11.22, das probandas da família II e IV, de pacientes do Hospital Universitário de Brasília e do Hospital de Apoio da Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Os traços pontilhados identificam a região de congruência entre as duas pacientes deste estudo.

Discussão

A maioria das características fenotípicas apresentam herança complexa, ou seja, são determinadas pela soma da contribuição de genes principais, genes secundários e efeito ambiental. Porém, doenças e/ou características com herança complexa possuem baixa

correlação entre genótipo e fenótipo (Dempfle et al. 2008). Um exemplo desse tipo de fenótipo é a agenesia dentária. O desenvolvimento do fenótipo de dentição se inicia durante o período embrionário e continua durante o período pós-natal até aproximadamente os 15 anos de idade. A determinação genética para dentição depende da expressão coordenada de mais de 300 genes (Tucker and Sharpe 2004) e, além disso, efeitos ambientais podem afetar o desenvolvimento desde o período pré-natal até a puberdade do indivíduo.

O resultado das alterações encontradas no CMA, tradicionalmente, obedece a uma série de critérios antes de ser considerado patogênico, não patogênico, ou, ainda, variações de significado clínico incerto (Miller et al. 2010). Critérios como o tamanho da alteração, conteúdo, tipo (deleções ou duplicações), descrição prévia em bancos de dados, herança e as características clínicas do paciente são considerados para a classificação (Hehir-Kwa et al. 2013; Pyatt and Astbury 2011). No entanto, é necessário ressaltar que no presente estudo a análise de CMA não foi rotineira. As particularidades começam pela natureza da característica observada, uma vez que hipodontia não é considerada uma doença. No caso, nenhuma das pacientes apresentaram malformações físicas nem displasias ectodérmicas. O perfil unificador, mas não homogêneo, das quatro pacientes foi a hipodontia. A agenesia dentária, ainda que seja uma má formação craniofacial, por ter um potencial de baixo impacto clínico e/ou baixo impacto na qualidade de vida do paciente, frequentemente é considerada apenas um desvio da normalidade. Assim, trata-se de um quadro clínico que não é considerado uma doença e, portanto, no escopo deste trabalho, opta-se por tratar agenesia como variação, assim como os CNVs encontrados. A nomenclatura de alteração patogênica para esses CNVs não traz ganhos na área médica e poderia gerar uma estigmatização entre as pacientes do estudo.

A base da contribuição genética para formação da agenesia não está caracterizada completamente, mas há registros de genes causadores dessa variação na literatura, dentre os quais destacam-se: *PAX9* (Mitsui et al. 2014), *MSX1* (Tallon-Walton et al. 2014), *AXIN2* (Lammi et al. 2004), *RUNX2* (Molin et al. 2015) e *WNT10A* (van den Boogaard et al. 2012). Mutações de ponto nesses genes mostraram associação com ausência congênita da dentição permanente. Ainda que a técnica aqui utilizada não acessasse mutações de pontos, buscou-se a existência de alterações numéricas nas regiões gênicas tradicionalmente descritas associadas à agenesia.

No entanto, não foi encontrado nenhum CNV dentro dos filtros utilizados na localização desses genes.

Ainda que o escopo deste estudo não seja a análise convencional dos CNVs, o raciocínio lógico seria encontrar uma alteração que fosse compartilhada entre as quatro probandas. Nessa análise encontrou-se uma duplicação no cromossomo 10, banda q11.22 em duas pacientes. O caso índice da família II apresentou uma duplicação de 1,8 Mb, enquanto a probanda da família IV teve um ganho submicroscópico de 1,3 Mb com uma área coincidente de aproximadamente 1,2 Mb: 10:46.975.076 – 48.167.553. As pacientes que apresentaram a duplicação em 10q11.22 tiveram suas duplicações caracterizadas da seguinte forma: probanda família II como BP1/BP5 e probanda família IV como sendo BP2/BP5. A área de 1,2 Mb coincidente é definida como sendo BP2/BP5.

O cromossomo 10 é formado por 99,4% de eucromatina e 1Mb de heterocromatina (Deloukas et al. 2004). Alterações nesse cromossomo sempre chamam a atenção, pois ele apresenta uma densidade de 10,4 genes por Mb e nele se encontram *loci* conhecidamente associados a doenças, como o gene supressor de tumor *PTEN* e o proto-oncogene *RET* (Deloukas et al. 2004). É interessante notar que grande parte dos genes contidos no cromossomo 10 apresenta processamento alternativo de íntrons: estão descritos 4204 transcritos para 1357 estruturas gênicas, além de *loci* complexos, incluindo 101 pares de genes codantes sobrepostos (Deloukas et al. 2004), o que revela a importância das alterações nesse cromossomo.

Duplicações cromossômicas são alterações que ocorreram frequentemente no processo evolutivo e que contribuíram para a divergência entre táxons. Foi demonstrado que a região cromossômica 10q11 sofreu várias levas de duplicação nos últimos 30 a 40 milhões de anos. Além disso, há uma inversão paracêntrica que ocorreu após a divergência entre os orangotangos e as outras espécies de grandes macacos (Crosier et al. 2002). No genoma humano há um grande número de famílias gênicas com diversas funções e que se originaram pelo processo de duplicação. Algumas dessas famílias gênicas são fundamentais ao desenvolvimento humano. Das famílias gênicas presentes no cromossomo 10, pode-se destacar *GLUD*, *CTSLL*, *ANX*, *CTGLF*, *BMS1L* e *FAM25*, sendo que todas apresentam genes codantes e pseudogenes (Deloukas et al. 2004).

O que se observa na literatura é que cada vez mais os CNVs têm sido identificados como causadores ou como contribuintes no condicionamento de doenças complexas, ou ainda, que possam estar em desequilíbrio de ligação com os genes causadores. Analisando as funções dos genes presentes na região de interesse, nenhum dos genes duplicados possuem descrição prévia relacionado ao fenótipo de hipodontia das pacientes, ainda que ocorra variação no estado de descrição existente para cada um dos genes.

Entretanto, há descrição no OMIM de que essa região é parte integrante de um mapa genômico (tamanho de 5 cM) associado à agenesia dentária (Liu et al. 2001; Wang et al. 2000). O mapa descrito foi estabelecido estatisticamente por meio de uma análise de ligação com o uso de marcadores do tipo microssatélite, que sugerem o posicionamento de um gene que contribua na determinação de agenesia dentária em uma área constituída por várias bandas citogenéticas do cromossomo 10. No entanto, a agenesia descrita no trabalho publicado em 2000 é do tipo oligodontia não síndrômica, pois não há descrição de outros sinais e sintomas associados ao fenótipo (Liu et al. 2001; Wang et al. 2000). O mesmo grupo de pesquisa foi responsável por uma segunda publicação em 2001 (Liu et al. 2001), quando a caracterização fenotípica foi refeita. Percebe-se que há uma descrição confusa a respeito do tipo de agenesia dentária que a família apresenta. Isso porque, após análise dos exames radiográficos, observou-se que alguns indivíduos apresentava a dentição permanente impactada, e não agênica.

Ainda, é preciso ressaltar que no estudo de 2001 foi considerada a agenesia dos terceiros molares, critério não incluído em nosso estudo (Liu et al. 2001). Por fim, outra característica que causou dúvida foi o fato de que parte da família apresentava os dentes de forma muito espaçada, o que dava a impressão de dentição ausente, mas após análise de radiografia, percebeu-se que todos os dentes estavam presentes. Essa informação levanta questionamentos, pois no artigo não há referência se esses dentes são microdentes. Assim, há dúvida se todos os indivíduos são afetados por oligodontia como descrito inicialmente, ou se após essas considerações alguns indivíduos poderiam ser classificados como afetados por hipodontia. Assim, diante do exposto, apesar dos casos descritos serem diferentes, percebe-se que a região 10q11.22 pode conter um ou mais genes participantes da determinação do fenótipo de hipodontia e merece maior atenção.

A redução da área de interesse pode nos ajudar na identificação do(s) gene(s) causador(es) do fenótipo de agenesia. Dessa forma, buscou-se a apresentação clínica dos cinco indivíduos do banco de *arrays* da UnB que apresentaram duplicação exata BP2/BP5 na tentativa de se corroborar os achados do presente estudo. Dentre as amostras do banco, tem-se que uma delas é de um tumor, cuja análise foi realizada para um grupo de pesquisa parceiro, que até o momento não disponibilizou dados sobre a amostra. As outras quatro amostras são referentes a pacientes síndrômicos, sendo um atendido no consultório de aconselhamento genético do HUB, e outros três provenientes do consultório de aconselhamento genético do Hospital de Apoio da Secretaria de Saúde do Governo do Distrito Federal.

Buscou-se nos prontuários características clínicas de agenesia, ou características que estão associadas à agenesia, como fenda palatina (FP) e lábio leporino (LL). Isso porque alguns autores argumentam que os fenótipos de FP/LL são expressões variáveis mais graves do espectro que inclui a agenesia dentária (Letra et al. 2007). No entanto, é importante ressaltar que no Brasil é rara a caracterização da dentição permanente dos pacientes nos consultórios de aconselhamento genético. Por isso, frequentemente não há informações quanto à ocorrência de hipodontia nesses indivíduos. Adicionalmente, é comum que esses pacientes de aconselhamento genético frequentemente não estejam dentro da faixa etária para diagnóstico de hipodontia (idade média de 13 anos de idade).

Das cinco amostras que apresentaram duplicação na posição genômica 10q11.22, uma menina, nascida em 2012, apresentou fenda palatina e lábio leporino. Hoje a paciente tem três anos de idade, e por isso não se pode realizar o diagnóstico de agenesia dentária. Uma segunda paciente, também do sexo feminino, nascida em 2012, apresentava má formação óssea, inclusive má formação da mandíbula. Contudo, ela veio a falecer no início de 2014, devido a complicações cardiorrespiratórias. Neste caso, também não foi possível o acompanhamento de desenvolvimento e diagnóstico de hipodontia. Então, ainda que a determinação de agenesia não esteja estabelecida, há evidências de que a área coincidente possa estar associada ao fenótipo de agenesia dentária, pois os pacientes apresentaram sinais clínicos compatíveis com o provável desenvolvimento de hipodontia.

Além da investigação das variações possivelmente patogênicas, avaliaram-se as outras variações da região 10q11.22. Como pode ser verificado nos resultados (Anexo 6), a região

congruente de 1,2 Mb apresenta 15 genes duplicados, sendo nove codificadores de proteínas, um codificador de RNA não codante e cinco pseudogenes. A lista completa com os genes, suas funções e referências no OMIM para a área coincidente pode ser verificada no Anexo 6. Dos nove genes codificadores, três estão descritos no OMIM por serem participantes da determinação de doenças – *GPRIN2*, *NPYR4* e *ANXA8*. No entanto, as funções descritas para estes genes não têm correlação direta com agenesia dentária. O gene *GPRIN2* é um fator de crescimento para as prolongações de células neuronais (Chen et al. 1999; Iida and Kozasa 2004). Já o gene *NPYR4* codifica uma proteína de membrana que faz parte de receptores hormonais pancreáticos (Lutz et al. 1997) e está relacionado à internalização dos neuropeptídeos Y, que têm função de estimular o apetite, regulação de estresse e ansiedade. Por fim, o gene *ANXA8* é da família das anexinas, família gênica formada por proteínas com capacidade de se ligarem a fosfolípidos, de maneira dependente de Ca^{2+} . Todas as proteínas dessa família compartilham um elemento estrutural formado por 70 resíduos de aminoácidos (Gerke and Moss 2002). As proteínas codificadas pelo *ANXA8* podem atuar como anticoagulantes vasculares e, frequentemente, estão super expressas em casos de leucemia mieloide aguda (Chang et al. 1992; Liu et al. 1994). Essa família gênica é altamente conservada evolutivamente e tem várias cópias ao longo do genoma. A região duplicada na presente análise encontra-se mais dois genes pertencentes a essa família, *ANX8L1* e *ANX8L2*, do inglês - *Annexin A8-Like1* e *Annexin A8-Like2*, respectivamente.

Uma vez que esses genes com ampla caracterização na literatura quanto à sua função não explicam os fenótipos observados nas probandas, procurou-se dentre os demais genes algum que pudesse explicar o fenótipo das pacientes (Anexo 6). Dentre os diversos genes encontrados, destaca-se o gene *LINC00842* (do inglês – *Long intergenic non-protein coding RNA 842*). Sugere-se que ele possa explicar o fenótipo encontrado nas pacientes das famílias II e IV. O gene *LINC00842* pertence à grande classe de ncRNA (RNAs longos não codantes), dentre eles, mais especificamente dos lincRNAs (RNA intergênico longo não codante). RNAs longos são semelhantes aos RNAm e em sua maioria têm função desconhecida. Em revisão, os lincRNAs são descritos como um conjunto de RNAs capazes de direcionar um complexo proteico capaz de mudar a conformação da cromatina para uma região específica no DNA, permitindo assim uma mudança na informação epigenética de um dado *locus* (Spizzo et al.

2012). Ressalta-se que essa regulação gênica é tecido-específica (Spizzo et al. 2012). O transcrito do *LINC00842*, além de ser do tipo lincRNA, também pode ser classificado como RNA antissenso. Estes transcritos normalmente não sofrem *splicing* e podem regular transcritos senso, mais especificamente, têm função de regulação gênica na fase de tradução. Os RNAs antissenso podem se parear por complementariedade aos transcritos primários e RNAs maduros e interromper a tradução das fitas em proteínas. Não há informações específicas sobre a função do gene *LINC00842*, mas a função descrita para sua classe gênica nos remete a um grande potencial biológico de regulação.

É interessante notar que num contexto tradicional de análise de CMA, as duplicações são mais frequentemente classificadas como não patogênicas, pois acredita-se que o excesso de produto gênico tem menor potencial de dano ao indivíduo do que a deficiência. O gene *LINC00842* está duplicado em todos os sujeitos BP2/BP5 aqui relatados, portanto, teoricamente, seu produto gênico estaria em excesso. De acordo com as funções descritas para os RNAs similares aos de *LINC00842*, verifica-se que o excesso do produto gênico desse *locus* tem um potencial de regulação negativa da expressão gênica de outro *locus*. Ou seja, ele pode suprimir, ou ainda, anular completamente o produto gênico de outros genes. Desta forma, analisando o indivíduo, temos um resultado num contexto molecular similar a uma deleção do gene anulado e/ou suprimido.

Em uma revisão sobre lncRNAs (Spizzo et al. 2012), há um extenso levantamento de dados mostrando diversos casos de relação entre lncRNAs e câncer. Um exemplo dado nesse mesmo artigo é a associação de carcinomas hepáticos com *IGFR2* - *Insulin like growth fator II* (Spizzo et al. 2012). Verificou-se que uma mutação de ponto foi capaz de modificar o padrão de *splicing* do gene, de forma que o transcrito formado resulta em cadeia polipeptídica completamente truncada, pois há criação de um *stop codon* prematuro. Desta forma, a proteína não exerce nenhuma de suas funções, seja ela de domínio transmembrânico, seja ela de sinalização para o tráfego lisossomal (De Souza et al 1995). Adicionalmente, sabe-se que há interação de nc-RNAs com o gene *IGFR2*, de forma que as modificações epigenéticas interrompem a transcrição, silenciando o gene (Yotova et al. 2008). Ainda que não existam relatos na literatura da relação direta de lincRNAs e o *locus IGFR2*, é possível sugerir que eles tenham essa via de ação. Destaca-se que ambas as pacientes que apresentaram a região

10q11.22 duplicada possuem câncer, assim como histórico familiar de câncer. Ainda que os cânceres apresentando sejam fenótipos bastante distintos, câncer colorretal e adenocarcinoma de ovário, reforça-se a ligação dos lincRNAs e câncer. Sendo assim, temos um exemplo de como o *LINC00842* poderia também ter relação com o fenótipo de câncer das pacientes do presente estudo.

Relatos de pacientes com agenesia e câncer foram descritos ainda em 2004, em um caso de uma família finlandesa com mutação no gene *AXIN2* que apresentava histórico familiar de agenesia dentária e câncer colorretal (Lammi et al. 2004). A família do estudo e a família da probanda IV parecem ter históricos similares. De acordo com o heredograma desta última família, há três pessoas afetadas com hipodontia e uma com oligodontia. Além disso, foi relatado pela família IV que o pai da paciente em questão (indivíduo I.1) também faleceu devido a um câncer intestinal.

Sabe-se que há uma série de genes associados a agenesia, contudo o gene principal para este fenótipo ainda não está estabelecido. Um dos genes pertencentes à lista de possíveis causadores de agenesia é o *AXIN2*, pois o produto deste gene faz parte da regulação da via de sinalização canônica da B-catenina, participando, desta forma, no padrão de proliferação celular (Li et al. 2015). Contudo, essa mesma via de sinalização o coloca associado a diversos tipos de câncer, sendo que há literatura que o descreve como oncogene em cânceres do tipo colorretal, hepático e câncer gástrico (Kim et al. 2014; Ying and Tao 2009). É necessário notar que a via de sinalização celular da qual o *AXIN2* faz parte é bastante conservada entre vários táxons diferentes. Dessa forma, essas vias apresentam uma grande importância dada por funções como proliferação, migração, e apoptose, dentre outras funções celulares (Li et al. 2015).

Dadas as funções do gene *LINC00842* e a relação do *AXIN2* com o fenótipo das pacientes, sugere-se que os seus produtos gênicos podem estar interagindo em nível molecular. Para que essa proposta se torne mais concreta, será necessário o sequenciamento do gene *AXIN2* em ambas as pacientes.

Conclusões

Foi observada uma duplicação em 10q11.22 presente em duas das quatro pacientes. As pacientes portadoras do CNV, probandas das famílias II e IV, são afetadas por câncer,

adenocarcinoma de ovário e câncer colorretal, respectivamente. A CNV em questão, duplicação encontrada em 10q11.22, também foi observada em cinco amostras do banco de dados do laboratório (n=558), sendo que uma das amostras refere-se a um tumor e as demais com pacientes com sinais clínicos compatíveis com o provável desenvolvimento de hipodontia. Assim, diante dos genes encontrados na região coincidente entre os achados destas duas pacientes (Anexo 6), sugere-se que o gene *LINC00842* pode estar envolvido na expressão fenotípica de agenesia e câncer.

Considerações Finais

A suspeita de associação entre agenesia dentária e alguns tipos de câncer, como colorretal e ovariano, partiu da observação de agenesia dentária em pessoas que apresentavam câncer (Chalothorn et al. 2008; Lammi et al. 2004). Os genes abordados nestes diferentes estudos fazem parte da odontogênese humana, porém não são exclusivos à expressão desse fenótipo. Todos os genes estudados têm muitas funções biológicas e poderiam atuar na determinação de fenótipos diferentes. Entretanto, diante do que foi abordado no capítulo 1, não foi possível determinar se no universo de pessoas com agenesia dentária é possível triar a suscetibilidade ao câncer de ovário.

A possibilidade de associar dois fenótipos cujas determinações ocorrem em momentos diferentes na história de vida de um paciente é muito atraente à comunidade médica. A perspectiva de se ter marcadores clínicos para ajudar a identificar cânceres conspícuos como o câncer de ovário, visa diminuir a taxa de mortalidade. Dessa forma, proporcionaria, também, uma economia à rede pública de saúde. Isso porque o custo de tratamento de um câncer em estágio avançado é potencialmente maior que o custo de tratar um câncer em fase inicial. Por isso, a busca por associação entre agenesia dentária e câncer vem sendo cada vez mais explorada na literatura científica (Bonds et al. 2014; Chalothorn et al. 2008; Kuchler et al. 2013; Lammi et al. 2004; Saboia et al. 2015).

Entretanto, diante de todo o exposto, é necessário cautela em se avaliar a associação entre fenótipos de herança complexa. Assim como todas as características complexas, é difícil correlacionar genótipo a fenótipo. Além disso, vários genes diferentes podem gerar fenótipos bastante parecidos, como é o caso da agenesia dentária. Desta forma, ainda que se tenha o cuidado de amostragem para a mesma classificação fenotípica, como mulheres afetadas por hipodontia, não há garantia de que todas as mulheres tenham uma etiologia comum, a não ser que se possa determinar geneticamente. Essa situação, na prática, é incompatível com estudos de abordagem populacional ou de caso-controle com grande número de amostras. Portanto, esta estratégia não parece financeiramente viável ao cotidiano dos pesquisadores brasileiros nesse momento, nem eficiente quanto aos resultados esperados. Contudo, todo esforço científico é

necessário para o entendimento da dinâmica dos fenótipos complexos como agenesia dentária e câncer.

Diante disso, uma nova abordagem científica foi aqui realizada na tentativa de se buscar respostas. Perante as considerações colocadas no capítulo 2, nota-se que há um grande potencial nas ferramentas de varredura genômica nos estudos investigativos de características complexas. Entraves como a descrição de função biológica de determinados genes podem dificultar os diagnósticos moleculares. No entanto, essa restrição deve perdurar ainda por muitos anos, pois se prevê que o conhecimento completo sobre o genoma humano está ainda longe de ser alcançado. Além disso, paradigmas estão sempre mudando. Um exemplo disso é a discussão atual sobre o conceito de gene. Tal debate não foi diretamente abordado aqui, no entanto, influencia a maneira como a genética médica interpreta os resultados de CMA à medida que novos conceitos estão sendo estabelecidos. Ademais, o panorama mais amplo dado pela varredura genômica dá mais suporte para relacionar genótipo com fenótipo. Desta forma, o investimento na análise de CMA parece ser uma ferramenta viável e eficiente para se avaliar fenótipos complexos.

Referências Bibliográficas

- American cancer Society Website. Overview: Ovarian Cancer, 2012. (http://www.cancer.org/docroot/CRI/CRI_2_1x.asp?rnav=criov&dt=33 - Acesso em 26/02/2015).
- Aasheim B, and Ogaard B. 1993. Hypodontia in 9-year-old Norwegians related to need of orthodontic treatment. *Scandinavian journal of dental research* 101(5):257-260.
- Airewele G, Adatto P, Cunningham J, Mastromarino C, Spencer C, Sharp M, Sigurdson A, and Bondy M. 1998. Family history of cancer in patients with glioma: a validation study of accuracy. *Journal of the National Cancer Institute* 90(7):543-544.
- Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, and Hamosh A. 2015. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM(R)), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research* 43(Database issue):D789-798.
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, and Eichler EE. 2002. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297(5583):1003-1007.
- Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, and Berdal A. 2008. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth: Part 1: Clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders. *Eur J Med Genet* 51(4):273-291.
- Barcelos R. 2006. Contribuição Genética de Duas Populações Urbanas da Região Centro-Oeste Brasileira Estimada por Marcadores Uniparentais. University of Brasilia. p 170.
- Bei M. 2009. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev* 19(5):504-510.
- Bergstrom K. 1977. An orthopantomographic study of hypodontia, supernumeraries and other anomalies in school children between the ages of 8-9 years. An epidemiological study. *Swedish dental journal* 1(4):145-157.
- Bonds J, Pollan-White S, Xiang L, Mues G, and D'Souza R. 2014. Is there a link between ovarian cancer and tooth agenesis? *European journal of medical genetics* 57(5):235-239.
- Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Hebert JM, Carotenuto L, Kidd KK, and Cavallisforza LL. 1991. Drift, Admixture, and Selection in Human-Evolution - a Study with DNA Polymorphisms. *P Natl Acad Sci USA* 88(3):839-843.
- Braude I, Vukovic B, Prasad M, Marrano P, Turley S, Barber D, Zielenska M, and Squire JA. 2006. Large scale copy number variation (CNV) at 14q12 is associated with the presence of genomic abnormalities in neoplasia. *BMC genomics* 7:138.
- Brook AH. 1974. Dental anomalies of number, form and size: their prevalence in British schoolchildren. *Journal of the International Association of Dentistry for Children* 5(2):37-53.
- Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B et al. . 2011. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *Jama-J Am Med Assoc* 305(22):2295-2303.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, and Thun MJ. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* 348(17):1625-1638.

- Chalothorn LA, Beeman CS, Ebersole JL, Kluemper GT, Hicks EP, Kryscio RJ, DeSimone CP, and Modesitt SC. 2008. Hypodontia as a risk marker for epithelial ovarian cancer: a case-controlled study. *J Am Dent Assoc* 139(2):163-169.
- Chang KS, Wang G, Freireich EJ, Daly M, Naylor SL, Trujillo JM, and Stass SA. 1992. Specific expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 79(7):1802-1810.
- Chen LT, Gilman AG, and Kozasa T. 1999. A candidate target for G protein action in brain. *The Journal of biological chemistry* 274(38):26931-26938.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chung J, and Ying SY. 2006. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med* 231(5):534-544.
- Cho EK, Tchinda J, Freeman JL, Chung YJ, Cai WW, and Lee C. 2006. Array-based comparative genomic hybridization and copy number variation in cancer research. *Cytogenetic and genome research* 115(3-4):262-272.
- Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, Barnes C, Conrad DF, Giannoulatou E et al. . 2010. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 464(7289):713-720.
- Crosier M, Viggiano L, Guy J, Misceo D, Stones R, Wei W, Hearn T, Ventura M, Archidiacono N, Rocchi M et al. . 2002. Human paralogs of KIAA0187 were created through independent pericentromeric-directed and chromosome-specific duplication mechanisms. *Genome research* 12(1):67-80.
- Deloukas P, Earthworn ME, Grafham DV, Rubinfeld M, French L, Steward CA, Sims SK, Jones MC, Searle S, Scott C et al. . 2004. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature* 429(6990):375-381.
- Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, and Schafer H. 2008. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *European journal of human genetics : EJHG* 16(10):1164-1172.
- Ellison JW, Ravnan JB, Rosenfeld JA, Morton SA, Neill NJ, Williams MS, Lewis J, Torchia BS, Walker C, Traylor RN et al. . 2012. Clinical utility of chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 130(5):e1085-1095.
- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, and Carter NP. 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *American journal of human genetics* 84(4):524-533.
- Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, and Goddijn M. 2006. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ* 332(7544):759-763.
- Galbraith RL, Poole EM, Duggan D, Muehling J, Hsu L, Makar K, Xiao L, Potter JD, and Ulrich CM. 2011. Polymorphisms in WNT6 and WNT10A and colorectal adenoma risk. *Nutrition and cancer* 63(4):558-564.
- Gayther SA, and Pharoah PDP. 2010. The inherited genetics of ovarian and endometrial cancer. *Curr Opin Genet Dev* 20(3):231-238.
- Gerke V, and Moss SE. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiological reviews* 82(2):331-371.
- Goddijn M, and Leschot NJ. 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Bailliere's best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 14(5):855-865.

- Godinho N. 2008. O IMPACTO DAS MIGRAÇÕES NA CONSTITUIÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES LATINO-AMERICANAS. University of Brasilia. p 160.
- Gomes RR, da Fonseca JA, Paula LM, Faber J, and Acevedo AC. 2010. Prevalence of hypodontia in orthodontic patients in Brasilia, Brazil. *European journal of orthodontics* 32(3):302-306.
- Gontijo C. 2008. Composição Genética de Duas Populações Afro-derivadas Brasileiras Inferida a partir de Marcadores Informativos de Ancestralidade. University of Brasilia. p 71.
- Goode EL, Chenevix-Trench G, Song H, Ramus SJ, Notaridou M, Lawrenson K, Widschwendter M, Vierkant RA, Larson MC, Kjaer SK et al. . 2010. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. *Nature genetics* 42(10):874-879.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, and de Leeuw N. 2013. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clinical genetics* 84(5):415-421.
- Hunter DJ. 2005. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6(4):287-298.
- Huppi K, Pitt JJ, Wahlberg BM, and Caplen NJ. 2012. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Frontiers in genetics* 3:69.
- Hurles M. 2005. How homologous recombination generates a mutable genome. *Human genomics* 2(3):179-186.
- Iida N, and Kozasa T. 2004. Identification and biochemical analysis of GRIN1 and GRIN2. *Methods in enzymology* 390:475-483.
- Jacobs P, Hassold, TJ. 1986. Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. *Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress*:234-244.
- Johannsdottir B, Wisth PJ, and Magnusson TE. 1997. Prevalence of malocclusion in 6-year-old Icelandic children. *Acta odontologica Scandinavica* 55(6):398-402.
- Kantaputra P, Kaewgahya M, and Kantaputra W. 2014. WNT10A mutations also associated with agenesis of the maxillary permanent canines, a separate entity. *American journal of medical genetics Part A* 164A(2):360-363.
- Kiemeny LA, Thorlacius S, Sulem P, Geller F, Aben KKH, Stacey SN, Gudmundsson J, Jakobsdottir M, Bergthorsson JT, Sigurdsson A et al. . 2008. Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 40(11):1307-1312.
- Kim JS, Park SY, Lee SA, Park MG, Yu SK, Lee MH, Park MR, Kim SG, Oh JS, Lee SY et al. . 2014. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell. *Molecular and cellular biochemistry* 387(1-2):71-79.
- Kuchler EC, Lips A, Tannure PN, Ho B, Costa MC, Granjeiro JM, and Vieira AR. 2013. Tooth agenesis association with self-reported family history of cancer. *Journal of dental research* 92(2):149-155.
- Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, and Nieminen P. 2004. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *American journal of human genetics* 74(5):1043-1050.
- Larmour CJ, Mossey PA, Thind BS, Forgie AH, and Stirrups DR. 2005. Hypodontia--a retrospective review of prevalence and etiology. Part I. *Quintessence Int* 36(4):263-270.

- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, and Vieira AR. 2007. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *Journal of dental research* 86(10):986-991.
- Li S, Wang C, Liu X, and Hua S. 2015. The roles of AXIN2 in tumorigenesis and epigenetic regulation. *Familial cancer* 14(2):325-331.
- Liu JH, Stass SA, and Chang KS. 1994. Expression of the annexin VIII gene in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 13(5-6):381-386.
- Liu W, Wang H, Zhao S, Zhao W, Bai S, Zhao Y, Xu S, Wu C, Huang W, Chen Z et al. . 2001. The novel gene locus for agenesis of permanent teeth (He-Zhao deficiency) maps to chromosome 10q11.2. *Journal of dental research* 80(8):1716-1720.
- Luisi S, Florio P, Reis FM, and Petraglia F. 2001. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 145(3):225-236.
- Lutz CM, Richards JE, Scott KL, Sinha S, Yang-Feng TL, Frankel WN, and Thompson DA. 1997. Neuropeptide Y receptor genes mapped in human and mouse: receptors with high affinity for pancreatic polypeptide are not clustered with receptors specific for neuropeptide Y and peptide YY. *Genomics* 46(2):287-290.
- Lynham A. 1990. Panoramic radiographic survey of hypodontia in Australian Defence Force recruits. *Australian dental journal* 35(1):19-22.
- Malhotra D, and Sebat J. 2012. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148(6):1223-1241.
- Mamotte CD. 2006. Genotyping of single nucleotide substitutions. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* 27(1):63-75.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. . 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics* 86(5):749-764.
- Mitsui SN, Yasue A, Masuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, and Tanaka E. 2014. Novel PAX9 mutations cause non-syndromic tooth agenesis. *Journal of dental research* 93(3):245-249.
- Molin A, Lopez-Cazaux S, Pichon O, Vincent M, Isidor B, and Le Caignec C. 2015. Patients with isolated oligo/hypodontia caused by RUNX2 duplication. *American journal of medical genetics Part A* 167(6):1386-1390.
- Muller TP, Hill IN, Peterson AC, and Blayney JR. 1970. A survey of congenitally missing permanent teeth. *J Am Dent Assoc* 81(1):101-107.
- Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, Kjaer SK, Mallin K, Mosgaard BJ, Purdie DM, Risch HA, Vergona R, and Wu AH. 2002. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *American journal of epidemiology* 155(3):217-224.
- Nieminen P. 2009. Genetic basis of tooth agenesis. *Journal of experimental zoology Part B, Molecular and developmental evolution* 312B(4):320-342.
- Nik-Hussein NN. 1989. Hypodontia in permanent dentition: A study of its prevalence in Malaysian children. *Australian Orthodontia* 11:93-95.
- Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, L'Heureux J, Pfundt R, Staaf J, van der Vliet WA et al. . 2008. Identification of novel

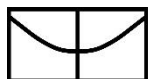
- candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *Journal of medical genetics* 45(2):81-86.
- Pfaff CL, Parra EJ, Bonilla C, Hiester K, McKeigue PM, Kamboh MI, Hutchinson RG, Ferrell RE, Boerwinkle E, and Shriver MD. 2001. Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *American journal of human genetics* 68(1):198-207.
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z et al. . 2014. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American journal of human genetics* 94(5):677-694.
- Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FPGM, and Kuijpers-Jagtman AM. 2004. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral* 32(3):217-226.
- Pyatt RE, and Astbury C. 2011. Interpretation of copy number alterations identified through clinical microarray-comparative genomic hybridization. *Clinics in laboratory medicine* 31(4):565-580, viii.
- Rodriguez CI, and Setaluri V. 2014. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics* 563:22-27.
- Rolling S. 1980. Hypodontia of permanent teeth in Danish schoolchildren. *Scandinavian journal of dental research* 88(5):365-369.
- Rose JS. 1966. A survey of congenitally missing teeth, excluding third molars, in 6000 orthodontic patients. *The Dental practitioner and dental record* 17(3):107-114.
- Saboia TM, Reis MF, Martins AM, Romanos HF, Tannure PN, Granjeiro JM, Vieira AR, Antunes LS, Kuchler EC, and Costa MC. 2015. DLX1 and MMP3 contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. *Archives of oral biology* 60(2):223-228.
- Salama FS, and Abdel-Megid FY. 1994. Hypodontia of primary and permanent teeth in a sample of Saudi children. *Egyptian dental journal* 40(1):625-632.
- Schouten PC, Marme F, Aulmann S, Sinn HP, van Essen HF, Ylstra B, Hauptmann M, Schneeweiss A, and Linn SC. 2015. Breast cancers with a BRCA1-like DNA copy number profile recur less often than expected after high-dose alkylating chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21(4):763-770.
- Shelling AN. 2012. Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease. *Mol Cell Endocrinol* 359(1-2):113-120.
- Shen J, Wang D, Gregory SR, Medico L, Hu Q, Yan L, Odunsi K, Lele SB, Ambrosone CB, Liu S et al. . 2012. Evaluation of microRNA expression profiles and their associations with risk alleles in lymphoblastoid cell lines of familial ovarian cancer. *Carcinogenesis* 33(3):604-612.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, and Sirotkin K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research* 29(1):308-311.
- Silva AG, Krepschi AC, Pearson PL, Hainaut P, Rosenberg C, and Achatz MI. 2014. The profile and contribution of rare germline copy number variants to cancer risk in Li-Fraumeni patients negative for TP53 mutations. *Orphanet journal of rare diseases* 9:63.
- Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, and Calin GA. 2012. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene* 31(43):4577-4587.

- Stankiewicz P, and Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in genetics* : TIG 18(2):74-82.
- Stenvers KL, and Findlay JK. 2010. Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrin Met* 21(3):174-180.
- Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF et al. . 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26):16899-16903.
- Tallon-Walton V, Manzanares-Cespedes MC, Carvalho-Lobato P, Valdivia-Gandur I, Arte S, and Nieminen P. 2014. Exclusion of PAX9 and MSX1 mutation in six families affected by tooth agenesis. A genetic study and literature review. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 19(3):e248-254.
- Team RC. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Thesleff I. 2003. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int* 34(8):613-620.
- Thesleff I. 2006. The genetic basis of tooth development and dental defects. *American journal of medical genetics Part A* 140(23):2530-2535.
- Tucker A, and Sharpe P. 2004. The cutting-edge of mammalian development; How the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 5(7):499-508.
- Usher CL, and McCarroll SA. 2015. Complex and multi-allelic copy number variation in human disease. *Briefings in functional genomics* 14(5):329-338.
- van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, Cune M, and Ploos van Amstel HK. 2012. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *Journal of medical genetics* 49(5):327-331.
- van der Veken LT, and Buijs A. 2011. Array CGH in Human Leukemia: From Somatics to Genetics. *Cytogenet Genome Res* 135(3-4):260-270.
- Wang H, Zhao S, Zhao W, Feng G, Jiang S, Liu W, Li S, Xue H, and He L. 2000. Congenital absence of permanent teeth in a six-generation Chinese kindred. *American journal of medical genetics* 90(3):193-198.
- Whittemore AS, Harris R, and Itnyre J. 1992. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *American journal of epidemiology* 136(10):1184-1203.
- Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, Jacobs KB, Gonzalez-Bosquet J, Hayes RB, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Berndt S et al. . 2009. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41(10):1055-1057.
- Ying Y, and Tao Q. 2009. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics* 4(5):307-312.
- Yotova IY, Vlatkovic IM, Pauler FM, Warczok KE, Ambros PF, Oshimura M, Theussl HC, Gessler M, Wagner EF, and Barlow DP. 2008. Identification of the human homolog of the imprinted mouse Air non-coding RNA. *Genomics* 92(6):464-473.
- Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, and Scherer SW. 2015. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* 16(3):172-183.
- Zhao H, Shen J, Wang D, Gregory S, Medico L, Hu Q, Yan L, Odunsi K, Lele S, and Liu S. 2012. Associations between Gene Expression Variations and Ovarian Cancer Risk Alleles Identified from Genome Wide Association Studies. *PloS one* 7(11).

Zhou B, Sun QM, Cong RH, Gu HJ, Tang NP, Yang L, and Wang B. 2008. Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: A meta-analysis (vol 108, pg 641, 2008). *Gynecol Oncol* 110(3):455-455.

Anexo 1 – Aprovação do projeto pela CONEP

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

A Senhora está sendo convidada a participar do projeto: “Genes candidatos à suscetibilidade a câncer no epitélio ovariano estão envolvidos na odontogênese humana?”. O objetivo desta pesquisa é avaliar se genes descritos na literatura como associados a câncer e a câncer de epitélio (tecido) ovariano estão relacionados com a odontogênese, isso é, a formação da dentição humana. Além disso, será avaliado o potencial pleiotrópico desses genes, isso é, avaliar o potencial de genes humanos atuarem na definição de diversas características em um mesmo organismo. Esse não é um teste genético para saber se a Senhora tem ou terá câncer. É uma pesquisa básica que não tem aplicação como diagnóstico, e sim, para saber melhor sobre a possível relação entre genes relacionados com câncer e com os dentes em humanos. A Senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la.

A sua participação é voluntária, isto é, não haverá pagamento por sua colaboração, e acontecerá através do preenchimento de questionários, exames laboratoriais, registro fotográfico e radiografias panorâmicas. A senhora poderá solicitar o ressarcimento referente aos gastos de deslocamento, no valor referente a duas passagens de ônibus locais, além de um pequeno lanche após os procedimentos. Os exames serão constituídos de análise de radiografias odontológicas e análise do seu DNA, seu material genético, que será obtido a partir de sangue venoso utilizando-se de equipamentos estéreis e descartáveis em ambiente apropriado. Esses procedimentos são seguros, oferecendo poucos riscos à saúde do voluntário. Em caso de efeitos colaterais decorrentes do procedimento, haverá pessoas capacitadas para atender os voluntários. Além disso, é seu direito como voluntária da pesquisa buscar indenização caso se sinta lesionada de alguma forma por ter participado desse estudo. A equipe de pesquisa garante que quaisquer decisões judiciais a respeito de pagamentos de possíveis indenizações serão cumpridas.

Os questionários e a coleta de sangue que a senhora deverá se submeter serão realizados no Laboratório de Genética Humana da Universidade de Brasília, na data combinada, com um tempo estimado de uma hora para sua realização. Caso seja necessário, novas radiografias serão realizadas em clínicas especializadas. As radiografias, assim como a coleta de sangue, serão realizadas sem custo nenhum para a senhora. A coleta de sangue será de um total de 8 mL de sangue venoso. Será avaliado um total de 10 pontos específicos de seu material genético, dentre eles: rs10088218, rs1516982, rs10098821, rs7576183 e outros seis pontos no gene WNT10A. Seu material genético será estocado em um biorrepositório na Universidade de Brasília, sob a responsabilidade da Dra. Silviene Fabiana de Oliveira. O biorrepositório fica em sala de acesso restrito e o material genético, assim como seus dados pessoais receberão códigos específicos o que dificulta o acesso às suas informações pessoais por qualquer pessoa alheia ao projeto. Informamos que a Senhora pode se recusar a participar de qualquer procedimento ou a responder qualquer questão, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para a senhora.

Os resultados dessa pesquisa produzirão conhecimentos de natureza científica básica, ou seja, produzirão conhecimentos acerca do funcionamento do material genético em humanos. De nenhuma forma será produzido informação útil para realização de diagnósticos, ou qualquer outro tipo de medicina personalizada. As informações retiradas do material genético das participantes farão sentido em contexto populacional e não individual. Diante disso, o Laboratório de Genética não oferece aconselhamento genético, pois não produzimos nenhum tipo de

informação que implique nesse tipo de cuidado. Além disso, os resultados não produzirão informação capaz de produzir preconceito ou estigmatização de pessoa ou classe. Os resultados serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador e não serão divulgados ou repassado a terceiros. Caso tenha interesse, o sujeito de pesquisa poderá ter acesso às informações provenientes de seu próprio prontuário.

Se a Senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Silviene Fabiana de Oliveira, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-3079, em horário comercial. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura do voluntário

Silviene Fabiana de Oliveira

Brasília, ____ de _____ de _____

Anexo 3 – Questionário



Genes candidatos à suscetibilidade a câncer no epitélio ovariano estão envolvidos na odontogênese humana?

Controle do pesquisador:

Tipo de amostra: Controle ☐ Caso ☐

Caso familiar: ☐ Sim ☐ Não

Coleta de sangue: ☐ Sim ☐ Não

O questionário está completo: ☐ Sim ☐ Não

O paciente passou pelo dentista: ☐ Sim ☐ Não

Dados no banco de dados: ☐ Sim ☐ Não

Dados Sujeito de Pesquisa:

Nome completo: _____ Sexo: F ☐ M ☐

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____ Local de Nascimento: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

País: _____ CEP: _____

Telefones: _____ E-mail: _____

Estado civil: _____ Estado conjugal: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Dados fenotípicos:

Classificação fenotípica (dada pelo pesquisador):

☐ Branco ☐ Negro ☐ Ameríndio ☐ Asiático ☐ Misto ☐ Outro: _____

Autoclassificação fenotípica (dada pelo sujeito de pesquisa):

☐ Branco ☐ Negro ☐ Ameríndio ☐ Asiático ☐ Misto ☐ Outro: _____

Índices de saúde:

Peso (kg): _____ Altura (m): _____

Pulso: _____ Pressão arterial (1°): _____ Pressão arterial (2°): _____

Responda as questões seguintes marcando “sim” ou “não” com relação ao sujeito de pesquisa:

Já fez algum tratamento dentário? ☐ Sim ☐ Não

Já houve extração de algum dente permanente? (Não considerar o dente do ciso) ☐ Sim ☐ Não

Já foi extraído dente do ciso? ☐ Sim ☐ Não

Você tem algum dente permanente que não nasceu? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

Você tem algum dente permanente que é pequeno ou tem formato estranho? ☐ Sim ☐ Não

☐ Não sei

Caso sua resposta tenha sido sim, esse dente já foi restaurado com prótese ou resina?

☐ Sim ☐ Não

Você já perdeu algum dente permanente acidentalmente? ☐ Sim ☐ Não

Você usa dentaduras completas? ☐ Sim ☐ Não

Você usa dentaduras parciais? ☐ Sim ☐ Não

Marcar os espaços abaixo caso o sujeito de pesquisa tenha algum parente de sangue que tenha ou que já teve alguma das seguintes condições médicas:

☐ câncer de ovário e/ou alguma doença autoimune;

☐ retardo mental, retardo no desenvolvimento, ou problemas de aprendizagem;

☐ problemas *congênitos* (exemplos: fenda palatina, surdez congênita, problemas cardíacos congênitos, espinha bífida, etc.);

☐ alguma mulher que perdeu mais de duas gestações;

☐ natimorto ou criança que morreu nos primeiros anos de vida;

☐ outras condições que podem ser hereditárias (exemplos: surdez, transtornos psiquiátricos, epilepsia, cegueira, doenças ósseas, distrofias musculares, cromossomopatias, etc.).

Em caso positivo listar as pessoas e o grau de parentesco do familiar afetado, descrever com os detalhes tudo o que o sujeito souber nos formulários adicionais. Caso o sujeito não saiba o ano exato de nascimento do familiar afetado, pedir um ano aproximado da realidade, exemplo: aprox 1936.

Dados da mãe do sujeito de pesquisa:

Nome da Mãe: _____

Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____

Algum problema médico ou de aprendizagem? _____

Data e causa da morte, se aplicável: _____

Número de gravidezes: _____ Número de filhos: _____

Todos os filhos são do mesmo parceiro? ☐ Sim ☐ Não. Se não, quantos parceiros? _____

Algum aborto? ☐ Sim ☐ Não Quantas semanas? _____

Causa dos abortos: _____
Nome da mãe (avó do sujeito de pesquisa): _____
Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____
Nome do pai (avô do sujeito de pesquisa): _____
Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____
Ancestralidade dos ancestrais, ou país de origem: _____

Sua mãe já foi diagnosticada, tratada, ou morreu de algumas das condições abaixo:

<input type="checkbox"/> Câncer de Ovário	<input type="checkbox"/> Endometriose	<input type="checkbox"/> Leucemia	<input type="checkbox"/> Câncer de Rim
<input type="checkbox"/> Câncer de Mama	<input type="checkbox"/> Lupus	<input type="checkbox"/> Câncer de Próstata	<input type="checkbox"/> Câncer na Tireóide
<input type="checkbox"/> Câncer Cervical	<input type="checkbox"/> Osteoporose	<input type="checkbox"/> Câncer de Fígado	
<input type="checkbox"/> Câncer de Pescoço/Cabeça			
<input type="checkbox"/> Câncer Uterino	<input type="checkbox"/> Esclerose Múltipla	<input type="checkbox"/> Câncer de Cólon	<input type="checkbox"/> Câncer de Pele
<input type="checkbox"/> Hipodontia	<input type="checkbox"/> Câncer de Pulmão	<input type="checkbox"/> outro	

Fumante? [] Sim [] Não

Dados do pai:

Nome do Pai: _____
Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____
Problemas médicos ou de aprendizagem? _____
Data e causa de morte (caso aplicável): _____
Número de filhos: _____ Todos os filhos com a mesma parceira? [] Sim [] Não
Nome da mãe (avó do sujeito de pesquisa): _____
Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____
Nome do pai (avô do sujeito de pesquisa): _____
Local de Nascimento: _____ Data de Nascimento: _____
Ancestralidade dos ancestrais, ou país de origem: _____

Seu pai já foi diagnosticado, tratado, ou morreu de algumas das condições abaixo:

<input type="checkbox"/> Câncer de Ovário	<input type="checkbox"/> Endometriose	<input type="checkbox"/> Leucemia	<input type="checkbox"/> Câncer de Rim
<input type="checkbox"/> Câncer de Mama	<input type="checkbox"/> Lupus	<input type="checkbox"/> Câncer de Próstata	<input type="checkbox"/> Câncer na Tireóide
<input type="checkbox"/> Câncer Cervical	<input type="checkbox"/> Osteoporose	<input type="checkbox"/> Câncer de Fígado	
<input type="checkbox"/> Câncer de Pescoço/Cabeça			
<input type="checkbox"/> Câncer Uterino	<input type="checkbox"/> Esclerose Múltipla	<input type="checkbox"/> Câncer de Cólon	<input type="checkbox"/> Câncer de Pele
<input type="checkbox"/> Hipodontia	<input type="checkbox"/> Câncer de Pulmão	<input type="checkbox"/> outro	

Fumante? [] Sim [] Não

Dados Núcleo Familiar:

Número de irmãos do sujeito de pesquisa: [] Homens [] Mulheres

Alguns deles são gêmeos?

Univitelinos: ☐ Homens ☐ Mulheres

Bivitelinos: ☐ Homens ☐ Mulheres

Existe doença genética na família? ☐ Não ☐ Sim. Qual? _____

Parentesco dos afetados: _____

Observações: _____

Dados do Cônjuge do Sujeito de Pesquisa:

Nome completo: _____ Nº: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Local de nascimento: _____

Parentesco: ☐ Não ☐ Sim Qual: _____

Início do relacionamento: ____ / ____ / ____ Término: ____ / ____ / ____

Local do início do relacionamento: _____

Residência atual: _____

Número de Filhos: Total ____ ☐ Homens ☐ Mulheres

Gêmeos: ☐ Não ☐ Sim Quantos: _____

Aborto: ☐ Não ☐ Sim Quantos: _____

Morto após o nascimento: ☐ Não ☐ Sim Quantos: _____

No futuro, caso seja necessário, a equipe do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília poderá entrar em contato com o sujeito de pesquisa para uma segunda coleta de material? (O contato será realizado através dos dados deixados em nossos formulários).

☐ Sim

☐ Não

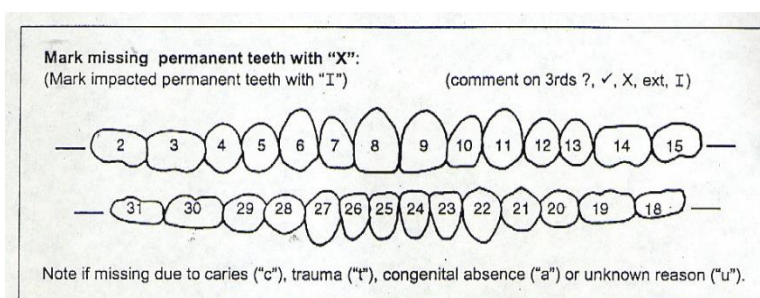
Nomes de outros membros de sua família que estão participando de estudos no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília: _____

Histórico Dentário:

Histórico Dentário do paciente: _____

Breve histórico geral da saúde do sujeito de pesquisa: _____

Marcar os dentes permanentes ausentes com "X"



(marcar os dentes permanentes impactados/ inclusos com "I") (Nota sobre os terceiros molares: ?, ✓, X, ext, I)

Anotar se a ausência dentária se deve a cáries ("c"), traumatismos ("t"), ausência congênita ("a") ou razão desconhecida ("u").

Hipodontia? ☐ sim ☐ não

Incisivos laterais pequenos? ☐ sim ☐ não

Discrepância de Bolton

Mx 6 Score _____

Mx 12 Score _____

Md 6 Score _____

Md 12 Score _____

Significância clínica (> 1.5)

☐ sim ☐ não

Histórico Familiar de Hipodontia?: _____

Etiologia dos dentes ausentes: dentes ausentes (não formados), extraídos, e/ou perdidos por traumas ou danos?

Notas do exame clínico: (informar caso tenha algum dente com formato, tamanho ou posição estranha, informar qualquer anomalia)

Medidas esqueléticas nas análises cefalométricas:

Medidas adicionais:

WITS: _____ (_____):

ANB: _____ (_____):

Diferença Mx-Md: _____ (_____):

Relação esquelética

Relação dentária

- ☐ Classe I
- ☐ Classe II 1ª Divisão
- ☐ Classe II 2ª Divisão
- ☐ Classe III

- ☐ Classe I
- ☐ Classe II 1ª Divisão
- ☐ Classe II 2ª Divisão
- ☐ Classe III

Notas adicionais de classificação angular: _____

Tem raios-X disponíveis na pasta do sujeito de pesquisa? _____

Temos autorização do sujeito de pesquisa (ou seu representante legal) para entrar em contato com o dentista do sujeito de pesquisa?

- ☐ sim ☐ não

Caso positivo, por favor, colocar nome, telefone e endereço do dentista do sujeito de pesquisa:

Notas da consulta com o dentista geral:

Poderemos entrar em contato com o sujeito de pesquisa para a fase 2? ☐ sim ☐ não

Notas adicionais:

Dentista responsável da Universidade de Brasília:

Pesquisador responsável do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília:

Muito obrigado pelo tempo disponibilizado para o preenchimento deste questionário.

Atenciosamente;

Silviene Fabiana de Oliveira
Laboratório de Genética Humana
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília

Responsável pelo preenchimento do questionário:

Data: ____ / ____ / ____

Anexo 4 – Histórico de familiares



Histórico Médico dos Familiares do Sujeito de Pesquisa

Relação com o sujeito de pesquisa:

Filho/Filha [] Irmão/Irmã [] Tio/Tia Materno

[] Tio/Tia Materno [] Sobrinho/Sobrinha Materno [] Primo/Prima Materno

Tio/Tia Paterno [] Tio/Tia Paterno

[] Sobrinho/Sobrinha Paterno [] Primo/Prima Paterno

Outro []:

Nome completo: _____

Sexo: F [] M []

A pessoa é viva: Sim [] Não []

Problemas médicos, ou de aprendizagem?

Classificação fenotípica (dada pelo sujeito de pesquisa):

[] Branco [] Negro [] Ameríndio [] Asiático [] Misto []

Outro: _____

Classificação fenotípica (dada pelo ENTREVISTADOR):

[] Branco [] Negro [] Ameríndio [] Asiático [] Misto []

Outro: _____

A pessoa é adotada: Sim [] Não []

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____ Local de Nascimento: _____

- | | | | |
|---|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Câncer de Ovário | <input type="checkbox"/> Endometriose | <input type="checkbox"/> Leucemia | <input type="checkbox"/> Câncer de Rim |
| <input type="checkbox"/> Câncer de Mama | <input type="checkbox"/> Lupus | <input type="checkbox"/> Câncer de Próstata | <input type="checkbox"/> Câncer na Tireóide |
| <input type="checkbox"/> Câncer Cervical | <input type="checkbox"/> Osteoporose | <input type="checkbox"/> Câncer de Fígado | <input type="checkbox"/> Câncer de Pescoço/Cabeça |
| <input type="checkbox"/> Câncer Uterino | <input type="checkbox"/> Esclerose Múltipla | <input type="checkbox"/> Câncer de Cólon | <input type="checkbox"/> Câncer de Pele |
| <input type="checkbox"/> Hipodontia | <input type="checkbox"/> Câncer de Pulmão | <input type="checkbox"/> outro | |

Fumante? [] Sim [] Não

Anexo 5 – Protocolo de Extração de DNA

Extração de DNA pelo método Puregene

Solução de Lise RBC	5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA pH 8,0
Solução de Lise Celular	10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 1% SDS
Solução de Precipitação de Proteína	7,5 M NH ₄ Ac 57,81g de acetato de amônia Completar para 100mL de H ₂ O destilada
Outros Agentes Utilizados	Isopropanol 100% Etanol 70% Tampão TE 1X
RBC	0,5 mL MgCl ₂ 1 M 0,2 mL EDTA 0,5 M Completar para 100mL de H ₂ O destilada
CLS	1 mL Tris 1 M 0,2 mL EDTA 0,5 M 10 mL SDS 10% Completar para 100mL de H ₂ O destilada

Etapa 1 – Lise Celular

- Adicionar 3 mL de sangue total a um tubo cônico de 15 mL contendo 9 mL da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;
- Centrifugar por 10 minutos a 3400 rpm (2000g). Remover o sobrenadante deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 µL de líquido residual;
- Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;
- Adicionar 3 mL da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspensas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses.

Etapa 2 – Precipitação da Proteína

- Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- Adicionar 1 mL da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;

- c) Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
- d) Centrifugar a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um *pellet* marrom escuro e compacto;

Etapa 3 – Precipitação do DNA

- a) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de isopropanol 100%;
- b) Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
- c) Centrifugar a 3400 rpm por 3 minutos, o DNA será visível como um *pellet* branco pequeno;
- d) Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 mL de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA;
- e) Centrifugar a 3400 rpm por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O *pellet* poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;
- f) Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

Etapa 4 – Hidratação do DNA

- a) Adicionar 200-250µL de tampão TE 1X (ou água) que resulta em uma concentração aproximada de 400 µg/µL. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
- b) Armazenar o DNA a 2-8° C;

Anexo 6 – Lista de Genes Encontrados na Área de Congruência da Região 10q11.22

Tabela 14. Lista de genes encontrados na duplicação da região 10q11.22 coincidente entre as probandas da família II e IV.

Gene	Função descrita	Referência
GPRIN2	<i>G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2</i> (outras anotações: GRIN2, KIAA0514). Gene codificador de proteína, validado pelo RefSeq. O gene pertence à família das proteínas G, e foi descrito como indutor de crescimento de estruturas celulares neuronais secundárias, como axônios e dendritos, sua expressão em humanos é descrita em cérebro e cerebelo.	OMIM #611240 NCBI Gene Id: 9721 (Iida and Kozasa 2004)
NPY4R	<i>Neuropeptide Y receptor Y4</i> (outras anotações: Y4, PP1, PPYR1, NPY4-R). Gene codificador de proteína, validado pelo RefSeq. Estudos funcionais demonstraram que o transcrito desse gene dá origem a receptor de membrana que se liga em diversos graus de afinidade com os hormônios pancreáticos: NPY, PPY e PP.	OMIM #601790 NCBI Gene Id: 5540 (Lutz et al. 1997)
ANXA8	<i>Annexin A8</i> (outras anotações: ANX8, CH17-360D5.2). Gene codificador de proteína, já revisado pelo RefSeq. A família gênica das anexinas é bastante conservada evolutivamente e possuem várias cópias ao longo do genoma. As proteínas dessa família estão envolvidas em processos de regulação do íon Ca^{2+} , sinalização celular depende do íon. Várias cópias bastante similares ocorrem ao longo do braço longo do cromossomo 10.	OMIM #602396 NCBI Gene Id: 653145 Gerke
ANXA8L1	<i>Annexin A8-Like 1</i> (outras anotações: ANXA8; ANXA8L2 ; VAC-beta; bA145E20.2). Gene funcional, codificador de proteínas, validado pelo RefSeq. Assim como o ANX8 pertencente à família das anexinas, essa proteína específica pode, indiretamente, funcionar como anticoagulante, pois ela inibe o	NCBI Gene Id: 728113

	complexo específico de tromboplastina. A superexpressão desse gene foi relacionado à leucemia mielóide aguda.	
ANXA8L2	<i>Annexin A8-Like2</i> . Gene funcional, pertencente à família das anexinas.	
FAM25C	<i>Family with sequence similarity 25 member C</i> (outras anotações: bA164N7.4). Gene codificador de proteína, validado pelo RefSeq. Pertencente a família gênica FAM25, que apresentam várias cópias de genes parólogos ao longo do genoma. Todos os genes dessa família tem uma origem evolutiva comum, porém ao longo da evolução as novas cópias gênicas dessa família desenvolveram novas funções biológicas. Não há função específica descrita para esse gene, com pouca informação disponível na literatura.	NCBI Gene Id: 644054
FAM25G	<i>Family with sequence similarity 25 member G</i> (outras anotações: FAM25A; FAM25B; FAM25C; bA301J7.4). Gene codificador de proteína, validado pelo RefSeq. Assim como o gene FAM25C, esse gene também pertence à família gênica FAM25. Ressalte-se que o presente gene faz parte de um locus complexo junto ao gene ANXA8, da família das anexinas. O locus complexo possui 20 transcritos descritos, sendo 19 delas formadas por processamento intrônico alternativo.	NCBI Gene Id: 100133093
FAM21B	<i>Family with sequence similarity 21 member A</i> (outras anotações: FAM21B; bA98I6.1; bA56A21.1). Gene codante, validado pelo RefSeq. O presente <i>locus</i> teve sua nomenclatura revista pelo HGNC, e atualmente tem como sigla FAM21A. Gene da mesma família gênica que FAM25C, FAM25G e FAM35DP, descritos anteriormente. A família FAM21 foi descrita como proteínas participantes do	NCBI Gene Id: 387680 Vicendeau et al 2010

	complexo RISP (do inglês - Revinteracting HIV suppressor proteins). A expressão gênica do grupo RISP influencia diretamente na capacidade de replicação do HIV em células humanas, sendo que redução da expressão gênica de RIPS aumenta a replicação do vírus.	
AGAP9	<i>ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 9</i> (outras anotações: AGAP-9; CTGLF6; bA301J7.2). Gene funcional codificador de proteínas, validado pelo RefSeq. Esse gene pertence à uma superfamília gênica com grande ramificações. A família ArfGAP é formada por genes de diferentes funções, mas todos tem propriedade comum de catalisar a molécula de ArfGTP em ArfGDP. Essa função é intrínseca aos processos biológicos que possuem redundância gênica em número elevado. Proteínas Arf fazem parte da superfamília proteica Ras formada por mais de 150 genes diferentes, constituintes as subfamílias: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran.	NCBI Gene Id: 642517 Khan et al 2008 Shiba & Randazzo 2014
LINC00842	<i>Long intergenic non-protein coding RNA 842</i> . É um gene à grande classe de RNAs não codantes, validado pelo RefSeq. Esse gene codifica um lncRNA do tipo antisense. Uma proposta mais recente para a função dos lincRNAs, os descreve como um conjunto de RNAs capazes de direcionar as proteínas <i>polycomb</i> para uma região específica no DNA, permitindo a remodelação da fita de cromatina. Portanto, modificando padrões epigenéticos. O transcrito desse gene além de ser do tipo lincRNA, pertence à classe de RNAs antisense, ou seja, ele também tem função de regulação gênica na fase de transcrição. Os RNAs antisense podem se ligar aos transcritos primários e RNAs maduros e interromper a tradução das fitas em proteínas.	NCBI Gene Id: 643650 Spizzo et al 2012

HNRNPA1P33	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 33</i> . Pseudogene com classificação provisória no RefSeq. Pertence à família de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNP). Essa família é formada por uma série de proteínas carreadoras de RNA. Elas se unem ao RNA mensageiro primário ainda no núcleo e paracem estar envolvidas no processamento e metabolismo dos transcritos primários.	NCBI Gene Id: 728643 (Strausberg et al. 2002)
FAM25BP	<i>Family with sequence similarity 25 member B, pseudogene</i> (outras anotações: FAM25A; FAM25B; FAM25C; FAM25G). Pseudogene, validado pelo RefSeq. Pertencente à mesma família gênica que FAM25C e FAM25G.	NCBI Gene Id: 100132929
FAM35DP	<i>Family with sequence similarity 35 member D, pseudogene</i> (outras anotações: FAM35B2). Pseudogene, com classificação provisória no RefSeq.	NCBI Gene Id: 439965
BMS1P2 BMS1P6	<i>BMS1, ribosome biogenesis factor pseudogene 6</i> (outras anotações: BMS1P2; BMS1LP2; BMS1LP6; bA302K17.2). Pseudogene, validado pelo RefSeq, teve sua nomenclatura revista em novembro de 2015 e o símbolo oficial agora é BMS1P6. Pertence à família de fator de biogênese ribossomal, os genes funcionais participam da formação da subunidade ribossômica 40s.	NCBI Gene Id: 642826
CTSL1P2	<i>Cathepsin L pseudogene 2</i> (outras anotações: CTSL1P2; CTSL1P5; CTSL1P7; bA144G6.6; bA342C24.4). Pseudogene, validado no RefSeq. O presente locus é um pseudogene pertencente à família das peptidases do tipo C 1. Os genes funcionais dessa família estão envolvidos na catabolização de proteínas, principalmente de cisteínas. O	NCBI Gene Id: 1517 Bryce et al 1994

	presente gene tem 88% de sua sequência similar ao gene CSTL (<i>cathepsin L</i>), contudo tem um stop códon prematuro e não possui produtos gênicos funcionais.	
--	---	--